

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GEONILDO RODRIGO DISNER

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS:

Estudos *in vivo* (*Hoplias intermedius*) & *in vitro* (células RTG2) e a questão ambiental

CURITIBA

2018

GEONILDO RODRIGO DISNER

ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS:

Estudos *in vivo* (*Hoplias intermedius*) & *in vitro* (células RTG2) e a questão ambiental

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Dra. Marta Margarete Cestari

Co-orientadora: Dra. Daniela Morais Leme

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Disner, Geonildo Rodrigo

Aspectos toxicológicos de nanopartículas metálicas: estudos *in vivo* (*Hoplias intermedius*) & *in vitro* (células RTG2) e a questão ambiental. / Geonildo Rodrigo Disner. – Curitiba, 2018.

111 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Marta Margarete Cestari

Co-orientadora: Daniela Morais Leme

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Dioxido de titânio. 2. Ensaio cometa. 3. Nanoestrutura. I. Título. II. Cestari, Marta Margarete. III. Leme, Daniela Morais. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GEONILDO RODRIGO DISNER** intitulada: **Aspectos toxicológicos de nanopartículas metálicas: Estudos *in vivo* (*Hoplias intermedius*) & *in vitro* (células RTG2) e a questão ambiental**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Março de 2018.

MARTA MARGARETE CESTARI
Presidente da Banca Examinadora

HELENA C. DA SILVA DE ASSIS
Avaliador Externo

CLAUDIA TURRA PIMPAO
Avaliador Externo

ANGELA MARIA PALACIO CORTÉS
Avaliador Externo

LILIANI MARILIA TIEPOLO
Avaliador Externo

APRESENTAÇÃO

Este documento foi estruturado como um compilado de produções científico-acadêmicas realizadas entre 2014 e 2018. O trabalho é um misto de artigos (publicados ou em processo de submissão) e ensaios direcionados a meios de divulgação científica que conjuntamente fundamentam esta tese de doutorado. O foco principal de estudo foram as nanopartículas, essas tem sido um poluente emergente pois são muito usadas pela indústria e tornaram-se um contaminante ambiental antes mesmo de haver um processo de investigação e regulamentação de seu uso. Através de ensaios e ferramentas de estudo toxicológico foi possível investigar a nível celular os efeitos deletérios desses compostos em peixes e em células de peixe em cultura. No entanto, mais do que estudar a toxicidade das nanopartículas através de testes experimentais controlados, esse trabalho busca aprofundar a reflexão do modelo industrial de produção desde sua raiz: a primeira revolução industrial, que contribuiu preponderantemente para as implicações sociais e ecológicas contemporâneas. Dessa forma, por meio dos resultados coletados buscou-se correlacionar todas as outras espécies naturais vulneráveis e os riscos que estas correm, bem como situar o ser humano como uma das partes integrantes das comunidades naturais, com influência mútua das partes.

O propósito principal dessa pesquisa foi desenvolver dados científicos sobre a toxicidade de alguns nanomateriais metálicos em modelos de estudo *in vivo*, utilizando peixes, e também consciente do novo movimento para a substituição do uso de animais em pesquisa, avançamos em estudos mais aprofundados usando métodos *in vitro*, com o cultivo celular de células de peixe, que nos permitiu melhor elucidar o mecanismo de ação das nanopartículas nas células. Embasado por esses dados científicos buscamos estabelecer um discurso crítico sobre a indústria química, e como foi construída nossa interpretação coletiva de desenvolvimento e progresso, bem como a estruturação do modelo hegemônico atual de produção, que supostamente move a economia, no entanto não considera as externalidades que podem ser tanto a degradação ambiental quanto a social.

A importância dos estudos de ecotoxicologia é refletido no considerável e crescente número de coletivos de pesquisa e publicações científicas acerca desse tema. Isso demonstra que os cientistas e colaboradores dos espaços formais de pesquisa estão comprometidos em contribuir para a investigação que garante a fundamentação do discurso sobre a crise ambiental e as políticas de enfrentamento.

Nos ensaios produzidos sobre a questão ambiental, cada trabalho se constitui de uma narrativa mais aprofundada do discurso sobre a crise ambiental, tendo em vista sua multidisciplinariedade. São referidos como ensaios porque não envolvem uma experimentação de caráter científico biológico, porém referem-se a pesquisa nas ciências sociais e filosofia da ciência, possibilitando assim discutir também os temas transversais, que no meu entendimento são necessários para a melhor compreensão sobre um objeto de pesquisa. Especialmente em trabalhos de doutorado, por mais que estejamos nos tornando especialistas, existe a necessidade de estudar um pouco sobre diversos assuntos e áreas que de algum modo se relacionam com o tema central, assim busco aqui materializar as inter-relações desses tópicos e contribuir para a construção do conhecimento e informação.

Estamos inspirados nos Objetivos Globais do Desenvolvimento Sustentável, propostos pela ONU, que sugerem como prioritários temas sobre combate as alterações climáticas, conservação dos recursos aquáticos, terrestres e da biodiversidade, produção e consumo sustentável, entre outros que buscam propagar uma relação mais harmoniosa entre as pessoas, e entre todos com o planeta.

Desejo que aprecie a leitura.

Geonildo Rodrigo Disner

RESUMO

O advento da nanotecnologia tem proporcionado um aumento expressivo na produção e uso de nanomateriais. Enquanto isso, a predição dos efeitos deletérios desses múltiplos compostos para organismos vivos ainda é um desafio para a ciência. Por suas propriedades físico-químicas singulares, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e atividade química, tornaram-se potencialmente atrativas em tecnologias industriais e medicinais. Devido ao extensivo uso dos nanomateriais manufaturados é inevitável que esses sejam liberados no ambiente de forma contínua a partir de descarte, lavagem dos produtos ou liberação através do desgaste. Desse modo, esses compostos são considerados relevantes contaminantes emergentes, pois o risco associado a sua presença pode não ser claramente conhecido e a presença em ambientes naturais é recente, além de ocorrer em baixos níveis, sendo difícil sua detecção. Nesse trabalho buscamos investigar o potencial tóxico de nanopartículas por diferentes abordagens. Nos ensaios *in vivo*, utilizando o peixe *Hoplias intermedius*, foram avaliados os efeitos da exposição a nanopartículas de Dióxido de Titânio (0,1; 1; 10 $\mu\text{g g}^{-1}$), bem como sua co-exposição com chumbo (21 $\mu\text{g g}^{-1}$) e alumínio (50 $\mu\text{g g}^{-1}$). Foi realizado o teste do cometa versão alcalina e medidos os biomarcadores enzimáticos: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reduzida, etoxiresorufina-O-deetilase e glutathione S-transferase. Não foi verificada genotoxicidade nessa espécie de peixe, porém as nanopartículas causaram alterações em alguns biomarcadores enzimáticos, como a diminuição da SOD (0,1 e 1 $\mu\text{g g}^{-1}$), GSH (1 $\mu\text{g g}^{-1}$), GST (0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$) e um aumento na atividade da EROD na maioria dos grupos de co-exposição. Devido ao fato de que a interação entre compostos químicos e formas vivas inicia no nível celular, buscamos aprofundar nossas análises utilizando um modelo *in vitro* de estudo usando células de peixe da linhagem RTG-2 a fim de prever o modo de ação das nanopartículas de Dióxido de Titânio (0,1; 1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e de Prata (0,01; 0,1 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) através do ensaio cometa em diferentes versões: alcalino, oxidativo (hOGG1) e *crosslink* (Proteinase K). Através dos dados demonstramos que ambas nanopartículas agem como *crosslinkers* entre DNA e proteína e causam danos oxidativos ao DNA. Tais partículas podem causar um risco a vida aquática e em consequência a todos os organismos direta ou indiretamente expostos. Devido ao fato desses novos contaminantes não serem regulados oficialmente, seu uso tem sido muito elevado e os riscos negligenciados. Nesse contexto, aproveitamos para discutir através do materialismo histórico a crise civilizatória contemporânea que tem ocasionado uma séria degradação ambiental, com causas econômicas e sociais interdependentes. A questão ambiental é um campo de discussão acerca dessa crise e contesta o modelo econômico e industrial bem como o destino da sociedade e reflete sobre a interação homem-natureza buscando uma relação de permanência, harmonia e equilíbrio. O desenvolvimento voltado a sustentabilidade é a melhor alternativa na promoção do aumento da qualidade de vida e o incremento das capacidades humanas que podem garantir a manutenção de todas as espécies.

Palavras-chave: Dióxido de Titânio. Nanomateriais. Ensaio cometa. Genotóxico. Métodos Alternativos à Experimentação Animal.

ABSTRACT

The advent of nanotechnology has provided an expressive increase in the production and use of nanomaterials. Meanwhile, the prediction of the hazard of these multiple compounds to living organisms is still a challenge to science. Because of their unique physicochemical properties, such as large penetration capacity, large surface area and chemical activity, they have become potentially attractive in industrial and medical technologies. Due to the extensive use of manufactured nanomaterials it is inevitable that they will be released into the environment continuously from disposal, washing of products or release through use. Thus, these compounds are considered relevant emerging contaminants, since the risk associated with their presence may not be clearly known and the presence in natural environments is recent, in addition to occur at low levels, being difficult to detect. In this work, we investigate the toxic potential of nanoparticles by different approaches. In the in vivo assays using the Hoplias intermedius fish, the effects of exposure to titanium dioxide nanoparticles (0.1 , 1 , $10 \mu\text{g g}^{-1}$) and their co-exposure with lead ($21 \mu\text{g}^{-1}$) and aluminum ($50 \mu\text{g}^{-1}$). The comet alkaline version was tested and the enzymatic biomarkers measured: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reduced, ethoxyresorufin-O-deethylase, and glutathione S-transferase. No genotoxicity was observed in this fish specie, but the nanoparticles caused changes in some enzymatic biomarkers, such as the decrease in SOD (0.1 and $1 \mu\text{g g}^{-1}$), GSH ($1 \mu\text{g g}^{-1}$), GST ($0.1 \mu\text{g g}^{-1}$) and increased EROD activity in most co-exposure groups. Due to the fact that the interaction between chemical compounds and living forms starts at the cellular level, we attempt to deepen our analyzes using an in vitro model of study with fish cells of the RTG-2 lineage in order to predict the mode of action of titanium dioxide (0.1 , 1 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) and silver nanoparticles (0.01 , 0.1 and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$). The toxicity was assessed by the comet assay in different versions: alkaline, oxidative (modified hOGG1) and crosslinks (Proteinase K). Through the data we show that both nanoparticles act as crosslinkers between DNA and protein and cause oxidative damage to DNA. Due to the fact that these new contaminants are not officially regulated, their use has been very high and the risks negligence. In this context, we take the opportunity to discuss through historical materialism the contemporary civilization crisis that has caused serious environmental degradation, with interdependent economic and social causes. The environmental issue is a field of discussion about this crisis that challenges the economic and industrial model as well as the destiny of society and reflects on the humankind-nature interaction seeking a relationship of permanence, harmony and balance. Sustainability-based development is the best alternative in promoting the increase of the quality of life and the increase of the human capacities that can guarantee the maintenance of all the species.

Key-words: Titanium Dioxide. Nanomaterials. Comet Assay. Genotoxic. Alternative Methods to Animal Testing.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA: REVISÃO TEÓRICA	09
A ERA NANO	10
NANOCIÊNCIA & NANOTECNOLOGIA	13
CAPÍTULO II: ESTUDOS EXPERIMENTAIS <i>In Vivo</i>	20
CO-EXPOSURE EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES AND METALS ON ANTIOXIDANT SYSTEMS AND DNA IN THE FISH <i>Hoplias intermedius</i>	21
INTRODUCTION	22
MATERIAL AND METHODS	23
RESULTS	29
DISCUSSION	32
CONCLUSION	38
REFERENCES	38
CAPÍTULO III: ESTUDOS EXPERIMENTAIS <i>In Vitro</i>	43
NANOMATERIALS INDUCE DNA-PROTEIN CROSSLINK AND DNA OXIDATION: A MECHANISTIC STUDY WITH RTG-2 FISH CELL LINE AND COMET ASSAY	
MODIFICATIONS	44
INTRODUCTION	46
MATERIAL AND METHODS	48
RESULTS AND DISCUSSION	51
CONCLUSION	57
REFERENCES	58
CAPÍTULO IV: SOBRE A QUESTÃO AMBIENTAL	62
SOBRE OS ASPECTOS SOCIAIS DA CRISE AMBIENTAL E AS IMPLICAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL NA SAÚDE COLETIVA	63
INTRODUÇÃO	63
DEBATE HISTÓRICO SOBRE A QUESTÃO AMBIENTAL	64
O TRIPÉ DA SUSTENTABILIDADE	67
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E SAÚDE COLETIVA	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
A QUESTÃO AMBIENTAL CONTEMPORÂNEA SOB A PERSPECTIVA DO MATERIALISMO HISTÓRICO	72
INTRODUÇÃO	73
CONTEXTO HISTÓRICO	74
REVOLUÇÃO INDUSTRIAL	75

O AVANÇO INDUSTRIAL NO PÓS-GUERRA	82
O AVANÇO DO AGRONEGÓCIO	85
MOVIMENTOS AMBIENTALISTAS E O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	95
CONSIDERAÇÕES GERAIS	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE	109

CAPÍTULO

I

NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA:

REVISÃO TEÓRICA

A ERA NANO *

Geonildo Rodrigo Disner

A nanociência vem revolucionando diversas áreas e está em produtos que você nem imaginava

Apesar das nanopartículas estarem presentes na natureza há milhares de anos, foi na década de 50 que o físico americano Richard Feynman, em conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física, sugeriu a construção e a manipulação, átomo a átomo, de objetos em escala nanométrica. A palestra apresentada por Feynman foi intitulada “Há mais espaços lá embaixo” e representou uma nova concepção em nanociência e nanotecnologia. Somente mais tarde, na década de 80, com a descoberta dos fulerenos, por Kroto, posteriormente, a síntese dos nanotubos de carbono por Iijima, os temas em nanociência e nanotecnologia, antes vistos como ficção, passaram a ser tratados com maior seriedade.

Como produto tecnológico, nanomateriais tem uma história mais recente, são as chamadas nanopartículas manufaturadas (*engineered nanoparticles*) que são produzidas pelo homem usando diferentes materiais como metais, óxidos metálicos, não-metais, carbono, polímeros e lipídios. Por outro lado, as nanopartículas naturais presentes no ambiente derivam de eventos como tempestades de poeira terrestre, erosão, erupções vulcânicas e incêndios florestais.

Para entender as dimensões da escala nanométrica, consideremos o fator de grandeza correspondente a 10^{-9} . Então, quando se fala de um nanômetro refere-se a um bilionésimo do metro. É exatamente nessa escala de tamanho que a nanotecnologia é trabalhada e que os objetos nanotecnológicos são concebidos. Nessa mesma escala estão os átomos e as moléculas. Para esclarecer com exemplos reais é só pensar que um nanômetro é aproximadamente 100 mil vezes menor do que o diâmetro de um fio de cabelo, 30 mil vezes menor do que um dos fios de uma teia de aranha ou 700 vezes menor que um glóbulo vermelho. Outro jeito de entender quão pequenas são essas partículas é considerar o tamanho de um bola de tênis em comparação com o planeta Terra, e nessa mesma escala, a bola de tênis é do mesmo tamanho em relação a Terra quanto uma nanopartícula em relação a bola de tênis, curioso, não é?!

Conceitualmente, existe uma tendência em considerar como nanopartícula um material ou estrutura com não mais de 100 nm de tamanho em pelo menos uma das dimensões.

* **Nota do autor:** Texto divulgado *online* pelo Portal Educação, artigos de Biologia. Publicado em: 07/04/2016. Disponível no endereço eletrônico: <https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/biologia/a-era-nano/72326>

Esta categorização é bastante artificial e arbitrária, especialmente do ponto de vista das interações biológicas. Esta definição está ainda em fluxo, e, por exemplo, a organização americana que controla a fabricação e registro de alimentos e medicamentos (*U.S. Food and Drug Administration*) usa a definição de 1-1.000 nm para compostos químicos e solicita informações para ingredientes com menos de 1.000 nm dos produtos sobre os quais regula.

Na natureza, a escala nano compõe muitas coisas facilmente reconhecidas, por exemplo, quando a água é misturada com o óleo, ocorre sobre a superfície um efeito chamado iridescência (efeito arco-íris). Efeito semelhante pode ser observado nas asas da borboleta azul (como as do gênero *Morpho*). Na verdade isso ocorre porque existem estruturas (nanoestruturas) que ao interagir com a luz modulam o índice de refração no qual a cor muda com o ângulo de observação ou iluminação causando interessante efeito óptico. Outro efeito muito interessante creditado à presença de nanoestruturas é o chamado efeito lótus, que ocorre em muitas folhas de plantas. Tal efeito faz com que a superfície fique extremamente hidrofóbica (tendência a repelir a água) e como resultado, a água não escorre, mas, literalmente, rola sobre o limbo da folha ou forma aquelas gotículas perfeitas.

Alguns desses efeitos observados na natureza despertaram a atenção dos cientistas e inovadores com o interesse de reproduzi-los para diversas finalidades. Nisso está o advento da nanotecnologia, que nada mais é do que explorar e aprimorar as capacidades que nanoestruturas possuem e atribuí-las novas finalidades. O termo “nanotecnologia” foi cunhado por Norio Taniguchi, em 1957, e não descreve apenas uma singular tecnologia, mas engloba uma gama de tecnologias que operam na escala de blocos de construção de materiais biológicos ou manufaturados, partindo do design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas através do controle da forma e tamanho em nanoescala.

Em escala reduzida os compostos podem diferir da sua contraparte correspondente a granel/brutos em relação a diversas características, como: área de superfície, forma, estabilidade, rigidez, revestimento e carga elétrica. Com a nanotecnologia é possível obter novas propriedades dos materiais, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, por exemplo, a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica. A essência da nanotecnologia consiste na habilidade de se trabalhar em nível atômico, molecular e macromolecular a fim de criar materiais, dispositivos e sistemas com propriedades e aplicações fundamentalmente novas. O controle rigoroso de variáveis, tais como pH do meio reacional, temperatura de calcinação e a dispersão das espécies químicas de interesse, é considerado crítico, especialmente quando se considera o controle do tamanho de partícula.

Muitos campos industriais empregam nanomateriais. Em óptica, é usado para fabricar revestimentos antireflexo. No domínio térmico, eles são utilizados para aumentar a transferência de calor a partir de coletores solares ou melhorar a eficácia do fluido de arrefecimento em transformadores ou melhorar a vida útil das baterias. Nanomateriais de uso industrial são usados para melhorar a resistência ao desgaste ou para criar novas estruturas, mais fortes, mais leves, ou ambas. Na eletrônica, são utilizados para aumentar o desempenho dos componentes como capacitores ou monitores embutidos em telefones celulares. A indústria farmacêutica utiliza para a fabricação de curativos antibacterianos, sondas para a detecção de doenças ou nanorobôs para entrega direcionada de medicamentos. No domínio ambiental, podem remediar solos contaminados e filtrar a água de forma mais eficiente.

Entre os nanomateriais de maior produção, pode-se utilizar como exemplo a nanopartícula de Dióxido de Titânio (nTiO_2), cuja produção anual alcançou 38.000 toneladas em 2011 nos Estados Unidos e mais de 10.000 toneladas na União Europeia em 2014. nTiO_2 é um pigmento branco usado principalmente na produção de tintas, tintas de impressão, produtos de plástico e papel, também utilizada em muitos produtos alimentícios (corante alimentar E171), cosméticos, protetores solares, cerâmicas, fibras e borracha.

Com tecnologias cada vez mais sofisticadas e grande aporte de investimento é possível que a nanociência avance muito nos próximos anos e equipamentos ou componentes mais eficientes sejam concebidos desde nanorobôs para tratamento de doenças até materiais para construção totalmente resistentes a deterioração. Quando o assunto são nanopartículas ainda há um universo de possibilidades a ser explorado.

NANOCIÊNCIA & NANOTECNOLOGIA*

Geonildo Rodrigo Disner; Marta Margarete Cestari

Resumo

Nanomateriais vem causando uma revolução na ciência e sua aplicação na tecnologia. Nanopartículas compreendem partículas entre 1 e 100 nanômetros de tamanho, mas este intervalo pode variar quando relativo à avaliação toxicológica. O uso extensivo e consequente produção de resíduos de nanomateriais tem levado esses produtos químicos para o meio ambiente causando possíveis contaminações. Portanto, como um assunto interdisciplinar fazemos aqui uma breve revisão sobre alguns aspectos interessantes e contemporâneos da nanotecnologia, especialmente focados em ciências ambientais e da conservação.

Palavras-chave: Nanomateriais. Nanotoxicologia. Ecotoxicologia. Dióxido de Titânio.

Nanoscience & Nanotechnology

Abstract

Nanomaterials has been causing a revolution on science and its application on technology. Nanoparticles comprehends particles between 1 and 100 nanometers in size, but the range could vary when concerning the toxicological assessment. The extensive use and consequent waste of nanomaterials has lead these chemicals to the environment causing possible contaminations. Therefore, as an interdisciplinary subject we briefly review here some interesting and contemporaneous aspects of nanotechnology, specially focused on environmental sciences and conservation.

Keywords: Nanoparticles. Nanotoxicology. Ecotoxicology. Titanium Dioxide.

* **Nota do autor:** Artigo de revisão curta (*mini-review*) publicado na revista multidisciplinar Evidência, Joaçaba. Volume 16, número 1, páginas 71-76, janeiro/junho de 2016. Disponível no endereço eletrônico: <http://dx.doi.org/10.18593/eba.v16i1.10660>.

Partículas de tamanho extremamente pequeno, apresentando uma dimensão entre 1 e 100 nm, estão presentes na natureza há milhares de anos. Apesar disso, os primórdios da nanociência são referidos a década de 50 em que o físico americano Richard Feynman (vencedor do Prêmio Nobel da Física em 1965) sugeriu a construção e a manipulação, átomo a átomo, de objetos em escala nanométrica. A palestra apresentada por Feynman na Reunião da Sociedade Americana de Física foi intitulada “Há mais espaços lá embaixo” (*There's Plenty of Room at the Bottom*) e representou uma nova concepção em nanociência e nanotecnologia. Nessa conferência, Feynman falou sobre os princípios da miniaturização e precisão ao nível atômico e como esses conceitos não violam nenhuma lei conhecida da física. Além disso, descreveu um processo através do qual a habilidade de manipular átomos e moléculas pode ser desenvolvida, utilizando um conjunto de ferramentas precisas para construir e operar um outro conjunto proporcionalmente menor, e assim por diante até a escala necessária. Além disso, ele expôs alguns passos necessários de serem tomados, a fim de começar a trabalhar neste campo inexplorado, incluindo o desenvolvimento de microscópios eletrônicos mais poderosos, ferramentas essenciais na visão do muito pequeno.

Existem sistemas na natureza que alcançam precisão de nível atômico sem a ajuda de design humano. Material nanométrico, incluindo fulerenos (C₆₀), ocorrem naturalmente a partir de processos de combustão, como incêndios florestais e atividade vulcânica e indiretamente da combustão de alta temperatura dos processos industriais. As nanopartículas naturais também incluem as partículas ultrafinas, relevantes no estudo da poluição do ar e sua epidemiologia. Bem como as nanoestruturas são constituintes naturais dos seres vivos, originando, por exemplo, as cores iridescentes das asas de borboletas ou o efeito lótus, que faz com que as folhas de algumas plantas sejam altamente hidrofóbicas.

As nanopartículas fabricadas/manufaturadas são aquelas deliberadamente produzidos, em contraste com as que existem na natureza, ou são subprodutos de outras atividades humanas. Nanomateriais manufaturados incluem partículas como as de carbono (fulerenos e nanotubos), óxidos metálicos (por exemplo, TiO₂ e ZnO), nanomateriais metálicos (Au e Ag), semicondutores (*quantum dots*) e nanomateriais orgânicos poliméricos. Por sua singularidade em propriedades físico-químicas, como grande capacidade de penetração, grande área de superfície e atividade química, tornam-se potencialmente atrativas em tecnologias industriais e medicinais ^{1,2}.

A nanotecnologia nada mais é do que explorar e aprimorar as capacidades que nanoestruturas possuem e atribuí-las novas finalidades. Compreende o *design*, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas através do controle da forma e tamanho em escala nanométrica. Esse termo foi cunhado por Norio Taniguchi, em 1957, e não descreve

apenas uma singular tecnologia, mas engloba uma gama que operam na escala de blocos de construção de materiais biológicos ou manufaturados. No seu artigo "Sobre o conceito básico de nanotecnologia" de 1974, Taniguchi desenvolveu as ideias de Feynman em mais detalhes, afirmando que nanotecnologia é a tecnologia de produção para obter a precisão extra alta e dimensões ultra finas, ou seja, a precisão e finura da ordem de 1 nm. A nanotecnologia é a tecnologia à escala molecular. Pode-se questionar se essa disciplina não existe já com o nome, bem antigo, de química. Porém, a nanotecnologia, em contraste com a química, procura construir novas moléculas e novos materiais juntando os seus constituintes, átomo a átomo, com uma individualidade e uma precisão que não se consegue quando se trabalha com uma multidão de moléculas. Essa tecnologia tem, de fato, bastante de química, mas também física, biologia, medicina, engenharia eletrotécnica, mecânica, química de materiais e biomédica. É interdisciplinar, uma das marcas da ciência moderna e as diferentes interfaces são ricas de relevantes problemas científicos e oportunidades de geração de novas tecnologias ³.

Do ponto de vista científico, um dos aspectos que acaba tendo influência sobre as aplicações dessa tecnologia reside no fato de que, na escala nanométrica, muitas propriedades fundamentais, como as químicas, físicas e mecânicas dos materiais, mudam radicalmente. Na dimensão atômica, trabalha-se com leis diferentes e, assim, devem ser esperados eventos diferenciados, outros tipos de efeitos e novas possibilidades ³. O pequeno tamanho e ampla área de superfície correspondente das nanopartículas conferem propriedades específicas a elas, por exemplo, fazendo delas desejáveis como catalisadores para reações químicas. A importância da área de superfície torna-se evidente quando se considera que os átomos de superfície ou moléculas desempenham um papel dominante em determinar as propriedades do material bruto, a taxa total de átomos ou moléculas de superfície aumenta exponencialmente com o decaimento do tamanho das partículas, tornando-as mais biologicamente ativas ⁴. No entanto, este aumento na atividade biológica pode ser tanto positivo ou negativo, ou ambos. Alguns efeitos interessantes são, por exemplo, atividade antioxidante, capacidade de carregamento de terapêuticos e penetração de barreiras celulares para entrega de drogas medicamentosas. Já efeitos indesejáveis podem ser a possível toxicidade, indução de estresse oxidativo ou disfunção celular. As mesmas propriedades que fazem das nanopartículas tão atrativas para o desenvolvimento de nanomedicina e para processos industriais específicos podem também tornar-se deletérios quando essas interagem com células.

Conceitualmente, existe uma tendência em considerar como nanopartícula um material ou estrutura com não mais de 100 nm de tamanho em pelo menos uma das dimensões. Esta

categorização é bastante artificial e arbitrária, especialmente do ponto de vista das interações biológicas. Assim, esta definição é artificial e está ainda em fluxo. A agência americana FDA, *Food and Drug Administration*, usa a definição de 1-1.000 nm para compostos químicos nanométricos e solicita maiores informações dos ingredientes com tamanho menor de 1.000 nm para os produtos que regula. Enquanto a Agência Europeia de Medicamentos também define nanotecnologia em uma faixa de tamanho menor que 1.000 nm. Muitas partículas pequenas, que medem mais de 100 nm apresentam um conjunto similar de comportamentos anatômicos e fisiológicos, como, por exemplo, alta reatividade e biodisponibilidade. Quando considera-se saúde e implicações ambientais é essencial uma definição de tamanho mais ampla para maior garantia de segurança ⁵.

Como produto tecnológico, nanomateriais tem uma história mais recente. Algumas aplicações no setor produtivo compreendem a energia (sistemas fotovoltaicos, células solares, baterias, pás para geradores eólicos); iluminação (LEDs em *quantum dots* para iluminação pública, domiciliar e automobilística); automobilístico (pinturas especiais que não riscam ou autolimpantes, catalisadores para gases de escapamento); embalagens (embalagens com propriedade de barreira, inteligentes e sensíveis a gases de decomposição); cosméticos (protetores solares, maquiagem); tecidos (resistência a sujidades-efeito lótus, bactericida); fármacos (nanoemulsões, drug-delivery, terapia de cânceres) e esportes (roupas esportivas antitranspirantes e antibacterianas, raquetes e tacos) dentre outras aplicações ³.

Devido ao extensivo uso dos nanomateriais manufaturados é inevitável que esses possam entrar no ambiente de forma contínua, a partir de lavagem dos produtos ou liberação através do desgaste durante o período de uso. Eles também estão sendo usados em materiais descartáveis como filtros e dispositivos eletrônicos e podem inevitavelmente alcançar o ambiente através de aterros e outros métodos de eliminação. Dessa forma, nanomateriais tem sido descobertos em locais onde não haviam sido detectados anteriormente ou encontrados em níveis diferentes dos esperados. Estes são genericamente designados como contaminantes emergentes ou CECs (*Contaminants of Emerging Concern*) porque o risco associado a sua presença pode não ser claramente conhecido e a preocupação é recente ⁶. Tais compostos tornaram-se emergentes, especialmente pelo seu uso ter sido intensificado e a partir de então sua disponibilização e presença nos ambientes ter aumentado. Muitos destes contaminantes, ainda não são contemplados em legislações ambientais. Sobretudo, no Brasil, esta questão acomoda grande importância devido à carência de políticas públicas sobre o tema, bem como os baixos índices de tratamento de efluentes, que são o principal fator de contaminação de águas superficiais e subterrâneas.

Grande parte da discussão sobre a saúde ambiental e implicações de nanopartículas é focado em materiais manufaturados. No entanto, muitas das questões de segurança e regulamentação relativas as nanopartículas fabricadas também são relevantes para as naturais/incidentais. Por exemplo, sabemos que a exposição a grandes níveis de nanopartículas incidentais pela poluição do ar urbano provoca aumento da incidência de doenças e até a morte entre os grupos vulneráveis da população ⁵.

Um grande número de atividades tem sido realizadas com o olhar voltado para os impactos da nanotecnologia sobre a saúde humana e o meio ambiente. Por se tratar de uma tecnologia incipiente, ainda não há um histórico importante relativo a tais aspectos, o que determina a necessidade de estudos experimentais intensivos. O rápido desenvolvimento do campo da nanotecnologia tem intensificado a exposição humana e de outros organismos às nanopartículas manufaturadas ⁴. Assim, avaliar a segurança dessas deveria ser uma das maiores prioridades tendo em vista sua ampla distribuição, devido as aplicações industriais e a sua inevitável presença no ambiente, ocasionando a exposição, direta ou indireta, seja pelo ar, água e/ou solo. Portanto, são necessários estudos mais detalhados do comportamento, distribuição e toxicidade desses compostos ⁷.

Consequentemente surgiu a Nanotoxicologia, uma disciplina que pode ser definida como a ciência dos nanodispositivos manufaturados e nanoestruturas que lida com seus efeitos em organismos vivos. Esta área de estudo busca acompanhar os progressos tecnológicos e estudar as possíveis implicações deletérias que as propriedades inovadoras conferidas a esses materiais podem causar sobre os seres expostos.

As nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO₂), por exemplo, são de longe as nanopartículas manufaturadas mais significantes em termos de produção, uso e exposição, baseado em estimativas de liberação no ambiente ⁸. Em um estudo específico, Keller ⁹ estimou que entre 63-91% do total de 260.000-309.000 toneladas de nanopartículas manufaturadas produzidas em 2010 acabaram em aterros, ou liberadas em diferentes compartimentos como nos solos (8-28%), corpos de água (0.4-7%) e atmosfera (0.1-1.5%).

Além da problemática ambiental que tais contaminantes podem causar no ambiente, ainda há evidências que nanopartículas podem carrear metais, ou seja, estes tem a capacidade de adsorção à superfície de algumas nanopartículas ¹⁰. Em experimentos com carpa, em que foi realizada exposição simultânea de nano-TiO₂ e cádmio, os peixes acumularam 146% mais metal comparados aos peixes expostos apenas ao cádmio ¹¹. O mesmo aconteceu com o metal arsênio

em peixes, que na presença de nano-TiO₂ os animais acumularam 132% mais metal comparados àqueles expostos na mesma concentração do arsênio sozinho ¹². Como o ambiente apresenta misturas complexas com diversos tipos de contaminantes, tal efeito de carreamento de outras substâncias pelas nanopartículas torna-se um agravante no que tange a biomagnificação de poluentes ao longo da teia alimentar.

Nanomateriais são regulados sem disposições específicas ao longo do mundo e um grande desafio é que não há métodos completamente padronizados para avaliação do risco do consumo a partir de produtos nanotecnológicos ou um conjunto de métricas acordadas para a caracterização de nanomateriais para determinar as concentrações ambientalmente relevantes. Assim, todas as tentativas de expandir o conhecimento acerca da exposição a nanomateriais são válidas. Devido ao expansivo uso de nanopartículas e o aumento dos riscos de exposição, há uma necessidade urgente de estudos de avaliação de risco e a regulamentação legislativa ¹³.

REFERÊNCIAS

- 1 Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The Potential Risks of Nanomaterials: A Review Carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology* 2006; 3 (1):1743–8977.
- 2 Kreyling W, Semmler-Behnke M, Muller W. Health Implications of Nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 2006; 8 (5): 543–562.
- 3 AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL- ABDI. Cartilha Sobre Nanotecnologia, 2010. Disponível em: <www.abdi.com.br>. Acesso em outubro de 2014.
- 4 Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113 (7): 823–839.
- 5 Friends of the Earth-FOE. Tiny Ingredients Big Risks: Nanomaterials Rapidly Entering Food and Farming, 2014. Disponível em: <<http://www.foe.org/news/news-releases/2014-05-new-report-tiny-ingredients-big-risks>>. Acesso em Jul 2016.

6 UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- EPA. Contaminants of Emerging Concern, 2014. Water-Science & Technology. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/cec/>>. Acesso em Set 2015

7 Handy RD, Henry TB, Scown TM, Johnston BD, Tyler CR. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology* 2008; 17:396–409.

8 Sun TY, Gottschalk F, Hungerbühler K, Nowack B. Comprehensive probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environmental Pollution* 2014; 185:69-76.

9 Keller AA, McFerran S, Lazareva A, Suh S. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research* 2013; 15.

10 Handy RD, Owen R, Valsami-Jones E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* 2008; 17: 315–325.

11 Zhang X, Hongwen S, Zhang Z, Niu Q, Chen Y, Crittenden JC. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide NPsparticles. *Chemosphere* 2007; 67:160–6.

12 Sun H, Zhang X, Niu Q. Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide NPsparticles. *Water Air Soil Pollution* 2007; 178: 245–254.

13 Kain J, Karlsson HL, Möller L. DNA damage induced by micro- and nanoparticles- interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis* 2012; 27 (4):491-500.

CAPÍTULO

II

ESTUDOS EXPERIMENTAIS *In Vivo*

CO-EXPOSURE EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES AND METALS ON ANTIOXIDANT SYSTEMS AND DNA IN THE FISH *Hoplias intermedius**

DISNER, G.R.; GUILOSKI, I.C; KLINGELFUS, T.; OYA SILVA, L.F.; LIROLA, J.R.; SILVA DE ASSIS, H.C. ; CESTARI, M.M.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles are the most produced and used engineered nanomaterial and their wide applications lead to environmental contamination. The aquatic environment is the major recipient of wastes containing nanoparticles and other co-occurring contaminants. We aimed to evaluate genotoxic and biochemical effects of acute exposure to nano-TiO₂ in the fish *Hoplias intermedius* and the interaction to metals. Besides assessing the nanoparticles' physical-chemical properties we performed an acute exposure with 0.1; 1; 10 µg g⁻¹ nano-TiO₂, alone and with lead (21 µg g⁻¹) and aluminium (50 µg g⁻¹). A set of biomarkers were evaluated in the liver such as genotoxicity by comet assay and biochemical biomarkers (SOD, CAT, GPx, GSH, EROD, GST). Most of the biomarkers were altered by the metals, and the nanoparticles caused decrease in SOD (0.1 and 1 µg g⁻¹), GSH (1 µg g⁻¹), and GST (0.1 µg g⁻¹). In co-exposure, some metal effects were attenuated. There was an increase in EROD activity for most co-exposure groups. Nano-TiO₂ was not genotoxic in the experimental conditions. We did not observe any increase in DNA breaks in co-exposure, although, nanoparticles changed the response of some biochemical biomarkers.

KEY WORDS: Comet assay. Complex mixtures. Ecotoxicology. Emerging contaminants. Genotoxicity. Nano-TiO₂.

* **Nota do autor:** Artigo publicado pela revista *Ecotoxicology and Environmental Contamination* (Ecotoxicologia e Contaminação ambiental). Volume 12, número 1, páginas 77-86. Enviado em 08/08/2017 e aceito em 10/10/2017. Disponível no endereço eletrônico: <http://dx.doi.org/10.5132/eec.2017.01.10>.

INTRODUCTION

Titanium dioxide nanoparticles (Nano-TiO₂) is one of the most produced and used engineered nanomaterial (ENM) worldwide, with an annual production in United States of about 10,000 tonnes per year (Sun *et al.*, 2014; Vance *et al.*, 2015). Nano-TiO₂ has a broad application mostly in coatings, paints, pigments, electronics, optics, cosmetics, energy, environmental applications, and as catalysts (Shaw & Handy, 2011). The extensive production increase and use of ENM will lead to environmental exposure by the generation of effluents or wastewaters, raising concern over environmental risks and impacts of nanotechnology (Clemente *et al.*, 2012). Nano-TiO₂ is the most significant ENM in terms of exposure, based on estimated release and use. Keller and colleagues (2013) estimated that 63-91% of over 260,000-309,000 metric tons of global ENM production in 2010 ended up in landfills, released in different compartments, such as into soils, water bodies, and atmosphere.

The care about environmental risks of ENM are raising, however, currently not much is known about their concentrations in the environment. In aquatic ecosystems, nano-TiO₂ may adsorb co-occurring chemical stressors, such as Cu(II), Cr(III), Mn(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Mo(VI) and alter their uptake (Kaur & Gupta, 2009; Tan & Wang, 2017). Zhang *et al.* (2007) found that carps exposed to cadmium in the presence of nano-TiO₂ accumulated 146% more Cd than controls. Nonetheless, there is little information about nano-interactions with others metals such as lead (Pb) and Aluminium (Al), considering that those two metals are commonly widespread at polluted environments.

Some research has shown that nanoparticles can readily penetrate a variety of cells, as their small size facilitates uptake across epithelial and endothelial cells (Kumar *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2013). Evidence suggests that nanometals can cause a range of sublethal effects in fish, including respiratory toxicity, disturbances to trace elements in tissues, inhibition of Na⁺K⁺-ATPase, and oxidative stress (Shaw & Handy, 2011). A study suggests that toxicity is greatly increased by harmful metals that go along with nanoparticles. A combination of metal and

nanoparticle would be able to exceed the membrane barrier, and generate reactive oxygen species (ROS) within the cell, which is the most known kind of damage that nanoparticles could cause (Wang *et al.*, 2017).

Both Pb and Al are well known chemicals, applied in a wide array of commercial and industrial applications, and have been widely studied (Klingelful *et al.*, 2015; Rybak *et al.*, 2017; Saghazadeh & Rezaei, 2017; Ferraro *et al.*, 2004).

Although the findings in the scientific literature are controversial about the toxicity of nanoparticles, information over safety and potential hazards is urgently needed. In this study, we selected the freshwater fish *Hoplias intermedius* as a test organism due to its importance as a top predator in the food chain, human consumption, and wide occurrence, especially at the Rio Doce watershed, in Brazil. Within this context, the aim of the present study was to investigate the genotoxic and biochemical effects caused by nano-TiO₂ and metals (Pb and Al) co-exposure after acute treatment on a freshwater fish.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The nano-TiO₂ used in this study was purchase from Sigma-Aldrich® [Titanium (IV) oxide nanopowder, 21 nm particle size (TEM), ≥99.5% trace metals basis] (Fig. 1). Nanoparticles suspensions were prepared in ultrapure water at the range of 0.01, 0.1, to 1.0 mg mL⁻¹. Immediately before exposition, the suspensions were sonicated in the ultrasonic bath (60 Hz) for 30 minutes for dispersing and to avoid aggregation. The stock solutions of lead and aluminium were prepared in ultrapure water at concentrations of 2.1 and 5.0 mg mL⁻¹, respectively. The dose of lead, 21 µg g⁻¹, applied in the present experiments was previous demonstrated to be effectively genotoxic by comet assay for both erythrocytes and kidney cells of a fish especie in the genus *Hoplias* (Ramsdorf *et al.*, 2009). The dose of aluminium was based on a previous work of Costa (2011),

where this dose of aluminium increased significantly the DNA damage on erythrocytes and hepatic cells of the fish *Rhamdia quelen*.

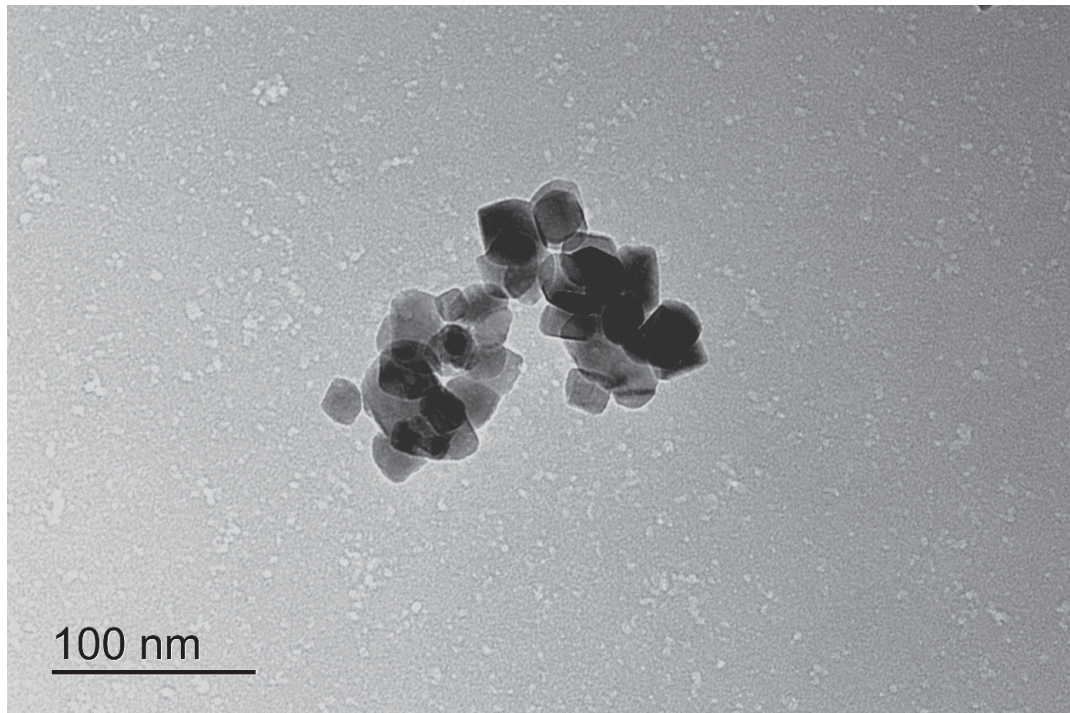


Figure 1: Titanium Dioxide Nanoparticles (Nano-TiO₂). Transmission Electron Microscopy, 300,000 X.

Characterization of nano-TiO₂

Transmission Electron Microscopy (TEM) and X-Ray Diffraction technique were used for the nanoparticle powder description. Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) was used to evaluate physical-chemical properties of the suspensions.

Experimental Design

The freshwater fish *Hoplias intermedius* were donated by the Pisciculture and Hydrobiology Station of Furnas. Once in the laboratory, they were housed in tanks (2,000 L) equipped with water filters and air pumps, and filled with dechlorinated water, for acclimatization during 2 months. They were fed everyday with supplemented commercial feed. The fish (15 per treatment) were randomly selected and distributed individually in 18 L tanks. Experiments were carried out under 27±1°C and 12:12 light-dark cycle. The average weight of the animals used in

the experiment was 15.31 ± 3.99 g and size 12.86 ± 1.2 cm (mean and standard deviation). None of the fish died during the experiment. As the exposure route, we choose intraperitoneal injection as a way to guarantee the correct delivery of the dosage proposed, especially treating with nanomaterial that tend to aggregate and disperse in aqueous exposure. The treatments were: Negative control (NC); Lead (Pb) $21 \mu\text{g g}^{-1}$; Aluminum (Al) $50 \mu\text{g g}^{-1}$; nano-TiO₂ $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ (NP1); nano-TiO₂ $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ (NP2); nanoTiO₂ $10 \mu\text{g g}^{-1}$ (NP3); and the co-exposure: Pb+NP1; Pb+NP2; Pb+NP3; Al+NP1; Al+NP2; Al+NP3. The animals received the intraperitoneal injections and 96 hours later they were anaesthetized with 150 mg L^{-1} of benzoacaine (Gontijo *et al.*, 2003) to collect the liver samples. The animals were not fed throughout the experimental period. We performed out all the procedures in accordance with animal welfare, approved by the Ethical Committee in Animal Experimentation of Federal University of Paraná, under the protocol 977/2016.

Comet assay

The alkaline single cell gel electrophoresis test was carried out according to Singh *et al.* (1988) with modifications by Ramsdorf *et al.* (2009). A tiny piece of liver tissue ($10 \mu\text{g}$) was mechanically desegregated in $500 \mu\text{L}$ of fetal bovine serum. Then $30 \mu\text{L}$ of the suspension were mixed with $120 \mu\text{L}$ of low melting point agarose (LMP) 0.5% (0.1g agarose, 20 mL phosphate buffered saline- PBS) and immediately placed on a slide pre-coated with normal agarose 1.5% (1.5 g , 100 mL PBS), covered with coverslip and kept refrigerated for 10 minutes. Subsequently, the coverslips were removed and the slides were placed in lysis solution (10 mM Tris; 100 mM dimethylethylene acetic acid (EDTA); 2.5 M chloride sodium (NaCl); dimethyl sulfoxide (DMSO 10%) for 24 hours. After that, the slides were kept in alkaline buffer solution [300 mM sodium hidroxiide (NaOH); 1 mM EDTA] for 25 minutes to unwinding the DNA and then electrophoresis was performed for 25 minutes at 25 volts and 300 mA. The slides were neutralized with a pH 7.4 buffer and fixed with absolute ethanol for five minutes. Comet formation was observed using a LEICA® epifluorescence microscopy after ethidium bromide staining. For each fish, 100 nucleoids

were counted and visually categorized according to damage, ranging from class 0 to 4 (Collins *et al.*, 1997), and a score was calculated with the sum of nucleoids number of each class multiplied by its respective class.

Biochemical analysis

Samples of liver were thawed on ice, weighed, and homogenized in potassium phosphate buffer (0.1 M pH 7.0) 1:10 (w/v), and then were centrifuged at $15,000 \times g$ for 30 minutes at 4°C. The supernatants were stored at -80°C until further analysis.

Superoxide dismutase (SOD)

We measured the SOD activity by analyzing the ability of SOD to inhibit the autoxidation of pyrogallol (Gao *et al.*, 1998), at 440 nm, in spectrophotometer. The supernatant was diluted 1:10 (v/v) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). In a microtube, 885 μL of buffer (1M Tris, 5 mM EDTA, pH 8.0) and 40 μL of sample were added. After agitation, we added 50 μL of 15 mM pyrogallol and the solution was incubated for 30 minutes. The reaction was stopped with 25 μL of 1N HCl. SOD activity was expressed as U mg^{-1} of protein. We described the amount of enzyme required to cause 50% inhibition as a unit of SOD.

Catalase (CAT)

We determined the CAT activity by the Aebi method (1984), which is based on the consumption of exogenous H_2O_2 by CAT, generating water and oxygen, with a gradual decrease in absorbance at 240 nm. The supernatant was mixed with a reaction medium (295 μL ; 20 mM H_2O_2 , 50 mM Tris-base, 0.25 mM EDTA, pH 8.0) in a microplate and absorbance decrease was measured for 1 min at 27°C and the activity was expressed as $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein⁻¹.

Glutathione Peroxidase (GPx)

We analyzed the GPx activity following the indirect method (Paglia & Valentine, 1967), from the reduction of oxidized glutathione (GSSG) to GSH in the presence of NADPH by glutathione reductase (GR) and a decrease in absorbance at 340 nm. Volumes of 10 μL of supernatant and 130 μL of reaction medium (3.08 mM of sodium azide; 0.308 mM β -NADPH, reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate; 1.54 U mL^{-1} glutathione reductase and 3.08 mM reduced glutathione in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0). After two minutes, we added 60 μL of 1.5 mM H_2O_2 . The activity was expressed as $\text{nmol min}^{-1}.\text{mg}$ of protein $^{-1}$.

Glutathione reduced (GSH)

The concentration of GSH was determined by the Sedlak & Lindsay method (1968). A volume of 50 μL of supernatant (after protein precipitation by 50% trichloroacetic acid and centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4°C) and 230 μL of TRIS (0.4 M, pH 8.9) were placed in a microplate, followed by addition of 20 μL of 2.5 mM DTNB in 25% methanol. Absorbance was determined at 415 nm and we calculated GSH concentration by comparison with the standard curve for GSH and expressed as $\mu\text{g mg}^{-1}$ of protein.

Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)

The EROD activity was determined according to Burke & Mayer (1974), with spectrofluorimetric determination of resorufin resulting from the metabolism of the 7-ethoxyresorufin by EROD. A volume of 50 μL of sample and 200 μL of reaction solution (2.6 μM 7-ethoxy-resorufin, 0.1 M TRIS, 0.1 M NaCl, pH 7.5) were kept in a microplate and incubated for 5 min. After incubation, we added 10 μL of NADPH (2.6 mM). The fluorimeter measurement was at a wavelength of 530 nm (excitation) and 590 nm (emission) for 10 min at 27°C and the activity expressed as $\text{pmol min}^{-1}.\text{mg}$ of protein $^{-1}$.

Glutathione S-transferase (GST)

The GST activity was determined based on the procedure described by Keen *et al.* (1976). The reaction is due to the conjugation reaction of the 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) substrate with reduced glutathione (GSH), catalyzed by GST, forming thioether. The supernatant (20 μ L) was placed in microplate, immediately followed by 180 μ L of reaction medium (3 mM GSH, 3 mM CDNB, 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5). The absorbance increase was measured at 340 nm and the activity expressed as $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein⁻¹.

Total protein quantification

The results from biochemical analyses were normalized to sample protein concentration through the Bradford method (1976). The calibration curve was obtained with bovine serum albumin as the standard.

We carried out the biochemical analyses on a BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc.).

Statistical analysis

For statistical analysis, we applied the normality test Kolmogorov-Smirnov. For genetic data with no normal distribution, we used the non-parametric test Kruskal-Wallis, and then we compared treatments by Student-Newman-Keuls test. For biochemical assays, ANOVA One-way (Post-test: Test-t LSD) was applied to compare groups. A significance level of $p < 0.05$ was set for all analysis. We performed a multivariate analysis to determine the principal components explaining the data variation.

RESULTS

The titanium dioxide powder was composed of 100% anatase, with a specific surface area (SSA) of $83.47 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (provided by supplier), 107 nm average particle size, and the particles surface chemistry was 28.42% titanium and 71.58% oxygen. The main physical and chemical properties of the suspensions are in Table 1.

Table 1: Physical-chemical properties of the nano-TiO₂ suspensions assessed by Zetasizer®.

Stock solution (mg mL ⁻¹)	Size (d.nm/intensity)	Zeta potential (mV)	Polydispersion stability (%)
0.01	338	-2.99 mV	91.10
0.1	137.5	-21.2 mV	76.48
1	1782 and 5105	-4.92 mV	57.27

We combined a set of biochemical biomarkers to assess the earliest cellular defense mechanisms triggered after chemicals exposure. In the groups treated with metals, Pb and Al, there was a general increase in the activity of all biochemical enzymes levels. The only exceptions were EROD under Pb exposure, and GST to Al.

In relation to the nanoparticles, the lowest concentration (NP1) reduced the activity of SOD and GST, and NP2 reduced SOD and GSH concentration. The NP3 dose alone did not change any of the biomarkers.

In co-exposure treatments of nanoparticles and metal, both GSH and GST decreased in NP1+Al and NP3+Al treatments. In general, we noticed attenuation in the differences of treated groups when compared to control. Usually, animals treated with mixed metal and nano-TiO₂ did not differ from the negative control, in contrast with the group exposed only to metals. Metals do have a stronger ability to interfere in the biochemical enzymes. This can be clearly seen in the case of SOD, and predominantly, in the CAT and GPx (Table 2).

EROD activity did not increase with Pb alone, but when it was associated with nano-TiO₂ in the lowest and highest concentration, the enzyme activity increased without a dose-specific

pattern to nano-TiO₂, but co-exposure caused an imbalance of activity of various biochemical biomarkers.

Table 2. Biochemical endpoints in liver of *Hoplias intermedius* after exposure to titanium dioxide nanoparticles-nanoTiO₂ and metals co-exposure.

	SOD	CAT	GPx	GSH	EROD	GST
NC	201.8±35.4	35.3±4.7	59.4±9.7	18.7±4.9	0.6±0.1	288.3±38.1
Pb	263.7±6.5 * b	43.2±6.2 *	71.6±16.3 *	35.2±10.3 * b	1.0±0.9 ab	331.4±33.2 * b
Pb+NP1	266.6±33.5 * b	38.7±7.0	75.2±9.1	29.2±6.5 * b	1.4±0.4 * b	362.1±47.7 b
NP1	163.3±31.6 * a	38.5±6.3	71.9±9.9	15.2±2.9 a	0.7±0.2 a	167.9±30.3 * a
Pb	263.7±6.5 * b	43.2±6.2 *	71.6±16.3 *	35.2±10.3 * b	1.0±0.9	331.4±33.2 * b
Pb+NP2	184.2±22.6 a	47.4±8.0 *	69.0±13.4	24.9±5.2 b	0.9±0.4	355.9±87.2 b
NP2	162.4±39.4 * a	42±10.8	65.9±23.1	11.3±1.1 * a	0.7±0.4	222.2±92.2 a
Pb	263.7±6.5 * b	43.2±6.2 *	71.6±16.3 *	35.2±10.3 * b	1.0±0.9	331.4±33.2 *
Pb+NP3	186.6±27.3 a	39.4±7.5	67.5±21.3	23.3±9.7 a	1.1±0.3 *	303.7±77.4
NP3	203.4±28.6 a	38.7±8.9	70.9±9.5	16.5±3.4 a	1.0±0.4	315.1±65.1
Al	252.6±52.1 * b	40.4±6.1 *	72.4±8.9 *	25.9±6.9 * b	2.8±1.7 * b	289±27.5 b
Al+NP1	177.8±27.9 a	35.2±5.7	76.8±10.4 *	13.4±2.8 * a	3.1±1.6 * b	173.8±18.7 * a
NP1	163.3±31.6 * a	38.5±6.3	71.9±9.9	15.2±2.9 a	0.7±0.2 a	167.9±30.3 * a
Al	252.6±52.1 * b	40.4±6.1 *	72.4±8.9 *	25.9±6.9 * b	2.8±1.7 * b	289±27.5
Al+NP2	232.4±37.5 b	34.2±5.7	64.9±7.1	17.2±3.9 b	4.1±3.7 * b	285.8±99.1
NP2	162.4±39.4 * a	42±10.8	65.9±23.1	11.3±1.1 * a	0.7±0.4 a	222.2±92.2
Al	252.6±52.1 * b	40.4±6.1 * b	72.4±8.9 *	25.9±6.9 * b	2.8±1.7 * b	289±27.5 b
Al+NP3	188.5±51.3 a	34.3±5.7 a	66.6±9.3	14.6±3.5 * a	1.3±0.3 * ab	174.2±46.5 * a
NP3	203.4±28.6 a	38.7±8.9 ab	70.9±9.5	16.5±3.4 a	1.0±0.4 a	315.1±65.1 b

The biomarkers values of the activity or concentration are expressed as mean ± standard error. NC: negative control; Pb: 21 µg g⁻¹; Al: 50 µg g⁻¹; NP1: 0.1 µg g⁻¹; NP2: 1.0 µg g⁻¹; NP3: 10 µg g⁻¹ of nano-TiO₂. * indicates significant difference with negative control (p<0.05). We used different letters to indicate synergic effects among each set of metal and nanoparticle co-exposure, the purpose is to show if the mixture present higher or lower toxicity in relation to the chemicals apart (p<0.05). SOD (U mg⁻¹ protein⁻¹), CAT (µmol min⁻¹ mg⁻¹ of protein⁻¹), GPx and GST (nmol min⁻¹ mg⁻¹ of protein⁻¹), GSH (µg mg⁻¹ of protein⁻¹) and EROD (pmol min⁻¹ mg of protein⁻¹).

Nanoparticles by themselves did not induce DNA damage, whilst both metals did (Fig.2).

Principal components analysis (PCA) is a qualitative demonstration of the combined data and it also shows data variation. For the first dataset (NC, NPs, Pb, and NPs+Pb) the two principal components contain 75.03% of the variation from the seven original variables (Fig. 3). For the analysis including the aluminium and nanoparticles (NC, NPs, Al and NPs+Al), the two principal components contain 61.58% of the variation. In addition, the comet assay and the EROD activity were the most representative biomarkers in the study, as they explain the main components of the PCA (Fig. 4).

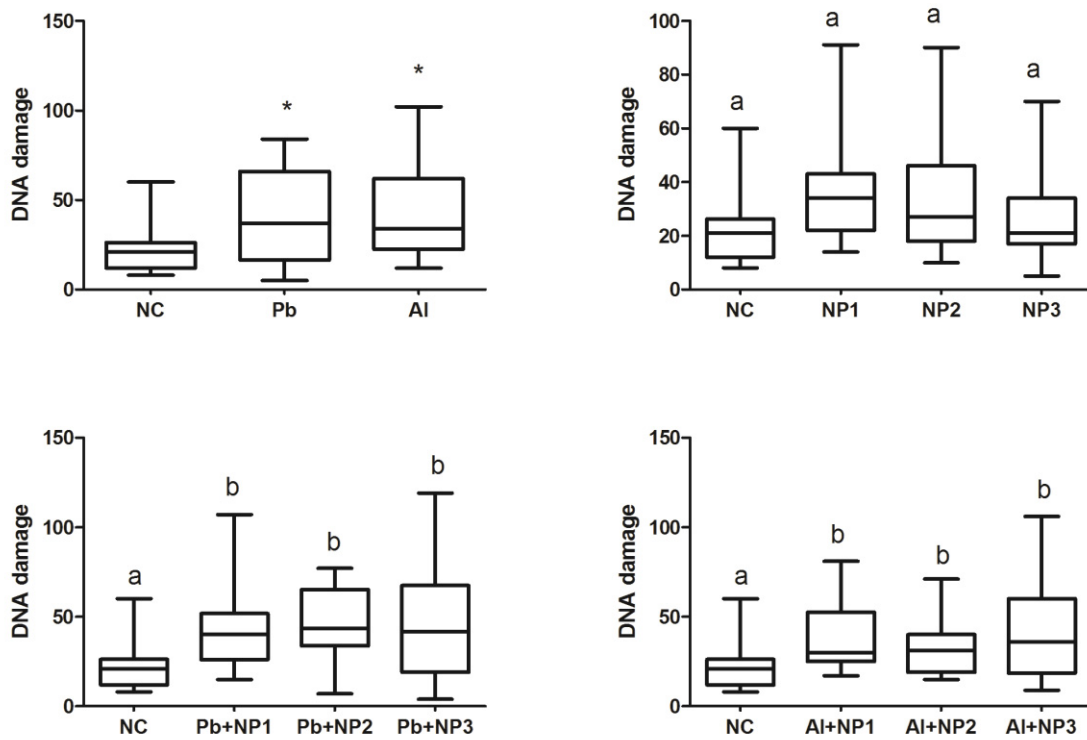


Figure 2: DNA damage assessed by comet assay in liver cells after acute exposure (96 h) of Titanium Dioxide Nanoparticles (nano-TiO₂) at the doses 0.1; 1 and 10 $\mu\text{g g}^{-1}$; (NP1, NP2, and NP3, respectively) and co-exposure with lead (Pb 21 $\mu\text{g g}^{-1}$) and aluminium (50 $\mu\text{g g}^{-1}$). The box and whisker plots show the median and the first and third quartiles. * represent statistically difference with the negative control (NC) and different letters indicate differences among treatments. Level of significance $p < 0.05$.

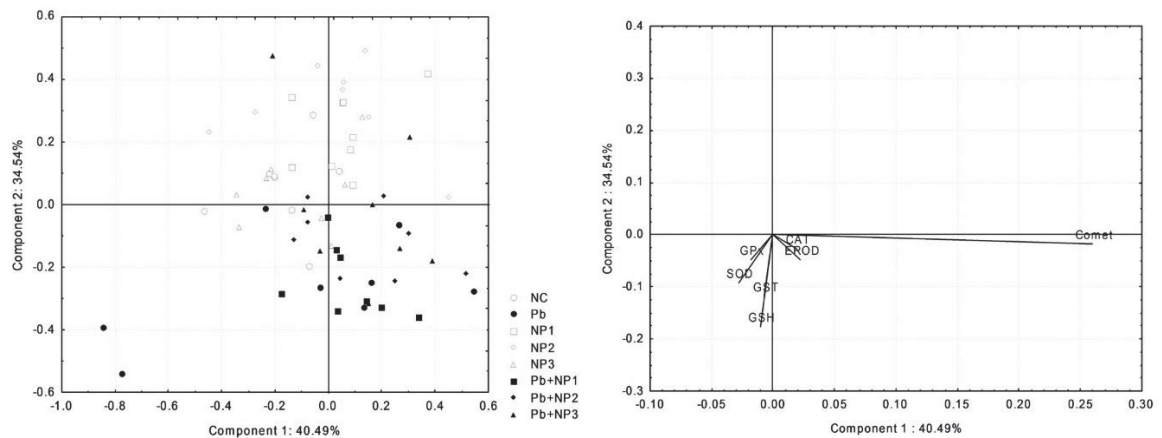


Figure 3: Principal component analysis (PCA) of the dataset composed for negative control (NC), lead (Pb 21 $\mu\text{g g}^{-1}$), nano-TiO₂ 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (NP1), nano-TiO₂ 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (NP2), nano-TiO₂ 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ (NP3), and NPs+Pb.

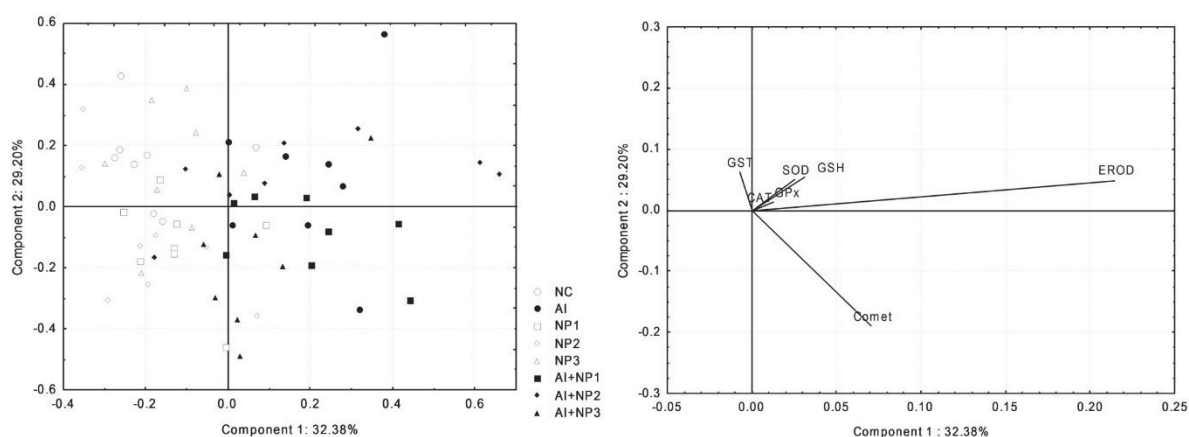


Figure 4: Principal component analysis (PCA) of the dataset composed for negative control (NC), aluminium ($50 \mu\text{g g}^{-1}$), nano-TiO₂ $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ (NP1), nano-TiO₂ $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (NP2), nano-TiO₂ $10 \mu\text{g g}^{-1}$ (NP3), and NPs+Al.

DISCUSSION

We prepared three different suspensions, in three concentrations, to ensure that the volume injected in each animal were the same. Besides the agglomeration of the particles, which was elevated in the most concentrated suspension, all of them had an unstable Zeta potential ($+30 \text{ mV} > \zeta > -30 \text{ mV}$). The magnitude of the Zeta potential indicates the degree of electrostatic repulsion between adjacent charged particles in a dispersion. If all the particles in suspension have low zeta potential values then there is no force to prevent the particles coming together and flocculating. Particles with zeta potentials more positive than $+30 \text{ mV}$ or more negative than -30 mV are normally considered stable (Malvern Instruments, 2005). The Zeta potential is a key indicator of the stability of colloidal dispersions that also presented a heterogeneous size pattern (polydispersion percentage higher than 20%), so not all the particles had the same size, even though they were around a core peak.

The wide variability in the nanoparticle research findings may be due to different chemical characteristics of nano-TiO₂ as well as experimental design. It is why comparisons between physical-chemical characteristics and *in vivo* endpoints are important to assess the biological responses. The elevated average size of the agglomerated nanoparticles is due to multiple primary particles and aggregates joined together by Van der Waal forces (Fig. 1). These particles can break

off when the micro environment conditions change, for example, after the entrance of an organism. Small particles may be released from large clusters that could not enter cells easily, eventually causing undesirable effects (US FDA, 2014).

Available scientific information does not establish a uniform upper boundary above 100 nm, where novel properties and phenomena similar to those seen in materials with dimensions in the nanoscale range cease. For this reason, Food and Drug Administration-FDA finds it reasonable to consider evaluation of materials with dimensions up to 1,000 nm, as a mean to screen material for further examination and to determine whether these materials exhibit characteristics related to the application of nanotechnology (US FDA, 2014).

However, it is important to note it is a somewhat arbitrary size cut off from the ecotoxicity bias. It might be prudent to consider aggregates of NPs that can be a few hundred nanometers wide (Federici *et al.*, 2007), or with a distribution of particles around the nanoscale, but having some primary particles larger than 100 nm (Handy *et al.*, 2008).

Regarding the particle size, all the NPs suspensions prepared had an average size higher than 100 nm, while the most concentrated had two peaks, both higher than 1,000 nm. Adverse effects at sublethal concentrations is extremely important in environmental assessment, since it may generate a cascade effect with consequences at the individual level, community, up to the ecosystem (Wu *et al.*, 2016).

Biochemical biomarkers offer the advantage of detection potentially toxic exposure well before adverse effects occur. In this study, several endpoints were included to understand the toxicological aspects of nano-TiO₂ and their interaction with metal compounds. Metals are substances with known toxic potential and because some biomarkers are highly sensitive, such change was expected. In relation to the nanoparticles, the biochemical endpoints were more affected by the low concentrations (NP1 and NP2), possibly because the size of some particles in the suspension was tiny. The highest concentration of nanoparticle did not interfere in the biochemical enzymes; it must be due to the size of the particles, which were predominantly greater

at this concentration than at any other (Table 1). This confirms the fact that the aggregates size has a direct influence on biological responses.

Superoxide dismutase (SOD) is an essential metalloenzyme to the antioxidant defense system as it catalyzes the dismutation of the superoxide radical (-O_2) to form hydrogen peroxide (H_2O_2). In addition, both the GST and GSH are important at antioxidant defense, removing oxygen radicals and reactivating intermediates, protecting cells against oxidative damage.

GSH can react with oxidant species well before they interact with macromolecules (Pompella *et al.*, 2003). GSH and GST decreased in some co-exposure treatments, and this can be explained by the use of GSH as a cofactor of GST in cellular dynamics, as GST catalyses the conjugation of glutathione with xenobiotics (Jemec *et al.*, 2010), thereby decreasing the compound. Therefore, a non-enzymatic cofactor can lead to a decrease of the enzyme that the cofactor is associated. Thus, the decrease of these biochemical biomarkers after exposure to nano- TiO_2 indicates a possible negative effect on the fish defenses to xenobiotics. Still, the reduction in enzyme activity can occur by binding of NPs or metabolites to these proteins.

Catalase decomposes the hydrogen peroxide, which is more stable than the superoxide anion, but it can also cause cell damage by ROS. Some of the H_2O_2 is produced by the cell through SOD, so when the SOD activity reduces, consequently, the activity of CAT is diminished or kept constant, due to less hydrogen peroxide being available to be decomposed by CAT.

Early contamination biomarkers are important because they respond in subcellular level and at the expense of any imbalance of homeostasis and physiological instability, even by low doses of chemical contamination. In ecotoxicological research, biochemical biomarkers are considered the most promising tool for such purposes, being early indicators for environmental disturbances, with quick response to stress.

The metabolic transformation of chemicals within the organisms is fundamental to change the compound biological activity and, as a result, decrease or increase chemical-cell interaction. Biotransformation includes numerous different enzymatic systems, which act over a variety of

substrates. The main set of enzymes related with early biotransformation reactions- phase I- are the flavoprotein monooxygenases and heme proteins. On the other hand, phase II reactions can be used to infer both exposure and effect, since a variety of xenobiotics can modify their activity (Sies, 1999).

In a study where carps (*Cyprinus carpio*) were exposed to 100 and 200 mg L⁻¹ of nano-TiO₂, the treatment caused statistically significant decrease in SOD and CAT, suggesting that the fish exposed to these NPs suffered from oxidative stress (Linhua *et al.*, 2009). Furthermore, Federici *et al.* (2007) measured nano-TiO₂ toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 14 days of exposure; it caused significant increases in the total glutathione levels in the gills and significant decreases in Na⁺K⁺-ATPase activity. They also related depletion of hepatic glutathione compared to controls, and some hepatocytes showed condensed nuclear bodies, indicating apoptosis.

In this study, nano-TiO₂ did not increase DNA damage, which indicates absence of genotoxicity in the tested doses under our tested conditions although different effects may be observed with different NP doses or exposures. As an example, Vignardi *et al.* (2015) exposed the marine fish *Trachinotus carolinus*, by intraperitoneal injection, to 1.5 and 3.0 µg g⁻¹ nano-TiO₂, and the results indicated genotoxicity and potentially cytotoxicity.

Xiong *et al.* (2011) studied the acute toxicity and oxidative effects of nano-scale titanium dioxide and their bulk counterparts in zebrafish. They have found that although the size distribution of nanoparticles was similar to bulk particles in suspension, the acute toxicity of the nano-TiO₂ to zebrafish was greater than of the bulk material, especially through a great generation of ·OH, while bulk particles were essentially non-toxic. Like in this study, the highest dose of NPs tested had in his colloidal suspension particles of large size (>1,000 nm), and probably because of that, the effects were bland. Although not considered as bulk yet, it is remarkable that the increase in particle size has a direct influence on the reduction of toxicity, as the hazard of some metallic NPs might be different to the traditional dissolved forms of metals (Shaw & Handy, 2011).

In the natural environment, there are many different compounds and most of them are present at low concentrations. The considerable raising concerns over toxicity is particularly essential when they are present as components of complex mixtures. Adverse effects would be caused not only by the nanomaterials themselves, but also to the capacity of NPs to modify bioavailability of other toxic pollutants such as heavy metals and toxic organic compounds (Rossi *et al.*, 2014).

There is evidence of “delivery effects” when the metal is present as a co-contaminant with a nanoparticle. This is related to the ability of metals to adsorb to the surface of some negatively charged NPs (Handy *et al.*, 2008). Other studies have shown that the presence of nano-TiO₂ may elevate the absorption of other contaminants in fish. For example, Zhang *et al.* (2007) exposed carps to cadmium for 25 days in the presence of nano-TiO₂ and found that the fish accumulated 146% more Cd compared to fish exposed only to Cd.

In the same way, TiO₂ nanoparticles had a significant adsorption capacity for Arsenic. Sun *et al.* (2007) exposed carp to the metalloid arsenic-As (V) in the presence of nano-TiO₂, and fish accumulated 132% more As than the treatment without nanoparticles. Most importantly, besides the enhanced metal accumulation when associated with TiO₂, the contaminants generally are able to interact and to alter some biomarkers. Rossi *et al.* (2014) also assessed the modulatory effect of nano-TiO₂ on Pb and they have found hepatic and neural effects over the fish *Hoplias malabaricus*.

Reeves *et al.* (2008) evaluated the *in vitro* cytotoxic and genotoxic potential effects of TiO₂ nanoparticles on goldfish skin cells (GFSk-S1) treated with 1.0, 10 and 100 µg mL⁻¹ nano-TiO₂ for only 24 hours. They have found that all doses caused significant increases in oxidative DNA damage. Therefore, for these fish cells, the nanoparticles were in fact genotoxic, but they could not conclude which sort of radical species was responsible for the DNA break effects, although it appears to be likely the ·OH. Accordingly, fish cells are generally more susceptible to toxic/oxidative injury than similarly treated mammalian cells.

Vevers & Jha (2008) also confirmed intrinsic genotoxic and cytotoxic potential of TiO₂ ENPs by the induction of DNA strand breaks, including oxidative damage to the DNA, and lysosomal membrane integrity in a metabolically competent fish cell line derived from rainbow trout gonadal tissue. It corroborates the evidence that fish cell lines can also provide important information on nanoparticles possible adverse effects.

In ecotoxicological studies, it is important to apply general and holistic approaches to evaluate biological responses to contaminants. A battery of biomarkers from different levels of biological organization can adequately identify hazard, and this is because the organisms used in the studies offer several endpoints that depend on their sensitivity, on the mode of action of the tested compounds, and time of exposure (Jemec *et al.*, 2010). A degree of ambiguity or inconclusiveness is inherent in some findings from certain assays as applied to nanosystems, sometimes due to intrinsic challenges associated with the analysis of nanomaterials (Jones & Grainger, 2009).

We used PCA to find patterns in the dataset and provide a concise approach and simple visualization of the data obtained from a large number of variables and measurements. We combined a set of data including the groups exposed to nanoparticles and mixed with each metal (Pb or Al). In the first situation, all biomarkers pointed out to the Pb direction in the data distribution, independently of the TiO₂ nanoparticles. All and every treatment containing Pb tends to cause the grouping of the data. In this general context, the nanoparticles seems not to be greatly relevant considering this overview created by a multivariate analysis, corroborating the weak toxicity of this compound found out during the tests. The fact that the main components were representative for an expressive percentage of variation is interesting because it demonstrated the low variability among the collected data. For the analysis including the aluminium and nanoparticles, again all the biomarkers tend to direct to the treatments including the Al. Then, as expected, the metals disturbed the animals' metabolism, and nano-TiO₂ did not really interfered in the process.

CONCLUSION

Nano-TiO₂ was not genotoxic to the fish *Hoplias intermedius* when evaluated by the comet assay in the experimental conditions, although in co-exposure it was able to change the levels of some important biochemical biomarkers compared to the control or metals exposure. Interactions among nanoparticles and other contaminants present in complex mixtures may be harmful by depleting the cellular defenses or restrain the detoxification mechanisms from functioning properly, at least in the studied fish.

Acknowledgments

The authors thank the Pisciculture and Hydrobiology Station of Furnas for the donation of the specimens; the professor Dr. Carmen Lúcia Voigt from State University of Ponta Grossa for the assistance with nanoparticle analysis; CNPq (Brazilian Agency for Science and Technology) and Fundação Araucária for the financial support.

REFERENCES

- AEBI, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol, 105: 121-126.
- BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem, 72: 248-254.
- BURKE, M.D. & MAYER, R.T. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. Drug Metab Dispos, 2(6): 583-588.
- CLEMENTE, Z., CASTRO, V.L., JONSSON, C.M. & FRACETO, L.F. 2012. Ecotoxicology of Nano-TiO₂- An Evaluation of its Toxicity to Organisms of Aquatic Ecosystems. Int. J. Environ Res, 6(1): 33-50.
- COLLINS, A.R., DOBSON, V.L., DUŠINSKÁ, M., KENNEDY, G. & ŠTĚTINA, R. 1997. The comet assay: What can it really tell us? Mutat Res, 375: 183–193. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00013-4)
- COSTA, P.M. 2011. Avaliação do efeito tóxico de sulfato de alumínio e sulfato de cobre em bioensaio de contaminação subcrônica via trófica no bioindicador *Rhamdia quelen* (Siluriforme). PhD Thesis. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 117p.

- CRANE, M., HANDY, R.D., GARROD, J. & OWEN, R. 2008. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17: 421-437. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0215-z>
- FEDERICI, G., SHAW, B.J. & HANDY, R.D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*, 84: 415-430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- FERRARO, M.V.M., FENOCCHIO, A.S., MANTOVANI, M.S., RIBEIRO, C.O. & CESTARI, M.M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Biol*, 27(1): 103-2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572004000100017>
- GAMELIN, F.X., BAQUET, G., BERTHOIN, S., THEVENET, D., NOURRY, C., NOTTIN, S. & BOSQUET, L. 2009. Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol*, 105: 731-738. <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
- GAO, R., YUAN, Z. & ZHAO, Z. 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem Bioenerg*, 45: 41-45. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00072-5](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00072-5)
- GONTIJO, A.M., BARRETO, R.E., SPEIT, G., VALENZUELA REYES, V.A., VOLPATO, G.L. & FAVERO SALVADORI, D.M. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res*, 534: 165-72. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00276-0)
- GOKSOYR, A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol*, 17: 80-95.
- GROSELL, M.H., HOGSTRAND, C. & WOOD, C.M. 1998. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 40: 275-91. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00026-X)
- HANDY, R.D., HENRY, T.B., SCOWN, T.M., JOHNSTON, B.D. & TYLER, C.R. 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish — a mechanistic analysis. *Ecotoxicology*, 17: 396-409. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0205-1>
- JEMEC, A., DROBNE, D., TISLER, T. & SEPCIC, K. 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies- lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res Int*, 17 (3): 571-581. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>
- JONES, C.F. & GRAINGER, D.W. 2009. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 438-456. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>
- JOVANOVIĆ, B. & PALIĆ, D. 2012. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish- Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquat Toxicol*, 118: 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.04.005>
- KAIN, J., KARLSSON, H.L. & MÖLLER, L. 2012. DNA damage induced by micro- and nanoparticles- interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis*, 27 (4): 491-500. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges010>

- KAUR, A. & GRUPTA, U. 2009. A review on applications of nanoparticles for the pre concentration of environmental pollutants. *J Mater Chem*, 19: 8279-8289.
- KEEN, J.H., HABIG, W.H. & JAKOBY, W.B. 1976. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. *J Biol Chem*, 251: 6183-6188.
- KELLER, A.A., MCFERRAN, S., LAZAREVA, A. & SUH, S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res*, 15: 1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>
- KLINGELFUS, T., COSTA, P.M., SCHERER, M. & CESTARI, M.M. 2015. DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminium sulfate. *Genet Mol Biol*, 38 (4): 499-506. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420140327>.
- KUMAR, A., PANDEY, A.K., SINGH, S.S., SHANKER, R. & DHAWAN, A. 2011. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere*, 83: 1124-1132. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.025>
- LAVICOLI, L., LESO, V., FONTANA, L. & BERGAMASCHI, A. 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15 (5): 481-508.
- LINHUA, H., WANG, Z. & XING, B. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci*, 21 (10): 1459-1466. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62440-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62440-7)
- MALVERN INSTRUMENTS Ltd. 2005. Zetasizer Nano Series- User manual. Nano 317, issue 2.2, Worcestershire, United Kingdom.
- NAKAGAWA, Y., WAKURI, S., SAKAMOTO, K. & TANAKA, N. 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat Res*, 394: 125-132. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00126-5)
- PAGLIA, D.E. & VALENTINE, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70 (1): 158-169.
- POMPELLA, A., VISVIKIS, A., PAOLICCHI, A., TATA, V. & CASINI, F. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*, 66: 1499-1503. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00504-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00504-5)
- RAMSDORF, W.A., FERRARO, M.V.M., OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A., COSTA, J.R.M. & CESTARI, M.M. 2009. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ Monit Assess*, 158: 77-85. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0566-1>
- REEVES, J.F., DAVIES, S.J., DODD, N.J.F. & JHA, A.N. 2008. Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res*, 640 : 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010>
- ROSENFELDT, R.R., SEITZ, F., ZUBROD, J.P., FECKLER, A., MERKEL, T., LÜDERWALD, S., BUNDSCHUH, R., SCHULZ, R. & BUNDSCHUH, M. 2015. Does the presence of titanium dioxide nanoparticles reduce copper toxicity? A factorial approach with the benthic amphipod *Gammarus fossarum*. *Aquat Toxicol*, 165: 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.011>

- ROSSI, S.C., MELA, M., BOSCHEN, S.L., CUNHA, C., FILIPAK NETO, F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., NEVES, A.P.P. & SILVA DE ASSIS, H.C. 2014. Modulatory effect of nano TiO₂ on Pb in *Hoplias malabaricus* trophically exposed. *Environ Toxicol Pharmacol*, 38: 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.013>
- RYBAK M., KOŁODZIEJCZYK A., JONIAK T., RATAJCZAK I. & GABKA M. 2017. Bioaccumulation and toxicity studies of macroalgae (Charophyceae) treated with aluminium : Experimental studies in the context of lake restoration. *Ecotoxicol Environ Saf*, 145 : 359-366. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.056>
- SAGHAZADEH A. & REZAEI N. 2017. Systematic review and meta-analysis links autism and toxic metals and highlights the impact of country development status : Higher blood and erythrocyte levels for mercury and lead, and higher hair antimony, cadmium, lead, and mercury. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 79 : 340-368. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.011>
- SCOWN, T.M., AERLE, R., JOHNSTON, B.D., CUMBERLAND, S., LEAD, J.R., OWEN, R. & TYLER, C.R. 2009. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidney of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. *Toxicol Sci*, 109(2): 372-380. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp064>
- SEDLAK, J. & LINDSAY, R.H. 1968. Estimation of total protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 21(1): 192-205.
- SHAW, B.J. & HANDY, R.D. 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. *Environ Int*, 37: 1083-1097. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.009>
- SIES, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27 (9/10): 916-921.
- SINGH, N.P., McCOY, M.T., TICE, R.R. & SCHNEIDER, E.L.A. 1988. Simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175: 184-191.
- SUN, H., ZHANG, X., NIU, Q., CHEN, Y. & CRITTENDEN, J.C. 2007. Enhanced accumulation of arsenate in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Water Air Soil Pollut*, 178: 245-254. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9194-y>
- SUN, T.Y., GOTTSCHALK, F., HUNGERBÜHLER, K. & NOWACK, B. 2014. Comprehensive probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ Pollut*, 185: 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>
- TAN, C. & WANG, W.X. 2017. Influences of TiO₂ nanoparticles on dietary metal uptake in *Daphnia magna*. *Environ Pollut*, 231: 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.024>
- TAVARES, A.M., LOURO, H., ANTUNES, S., QUARRÉ, S., SIMAR, S., TEMMERMAN, P.J., VERLEYSSEN, E., MAST, J., JENSEN, K.A., NORPPA, H., NESSLANY, F. & SILVA, M.J. 2014. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro*, 28: 60-69. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.009>
- US FDA (Food and Drug Administration). 2014. Guidance for Industry- Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>.

- VANCE, M.E., KUIKEN, T., VEJERANO, E.P., MCGINNIS, S.P., HOCELLA, M.F., REJESKI, D. & HULL, M.S. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol*, 6: 1769-1780. <http://dx.doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- VIGNARDI, C.P., HASUE, F.M., SARTÓRIO, P.V., CARDOSO, C.M., MACHADO, A.S.D., PASSOS, M.J.A.C.R., SANTOS, T.C.A., NUCCI, J.M., HEWER, T.L.R., WATANABE, I.S., GOMES, V. & PHAN, N.V. 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquat Toxicol*, 158: 218-229. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.008>
- WANG, G., JIN, W., QASIM, A.M., GAO, A., PENG, X., LI, W., FENG, H. & CHU, P.K. 2017. Antibacterial effects of titanium embedded with silver nanoparticles based on electron-transfer-induced reactive oxygen species. *Biomaterials*, 124: 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.028>
- WU, B., LI, X., SONG, J., HU, L. & SHI, X. 2016. Impact of extreme metal contamination at the supra-individual level in a contaminated bay ecosystem. *Sci Total Environ*, 102-9: 557-558. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.047>
- XIONG, D., FANG, T., YU, L., SIMA, X. & ZHU, W. 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci Total Environ*, 409: 1444-1452. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>
- ZHANG, X., SUN, H., ZHANG, Z., NIU, Q., CHEN, Y. & CRITTENDEN, J.C. 2007. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*, 67: 160-166. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.003>

CAPÍTULO

III

ESTUDOS EXPERIMENTAIS *In Vitro*

NANOMATERIALS INDUCE DNA-PROTEIN CROSSLINK AND DNA OXIDATION: A MECHANISTIC STUDY WITH RTG-2 FISH CELL LINE AND COMET ASSAY MODIFICATIONS

Disner G.R., Klingelfus T., Voigt C.L., Alle L.F., Cestari M.M., Leme D.M.*

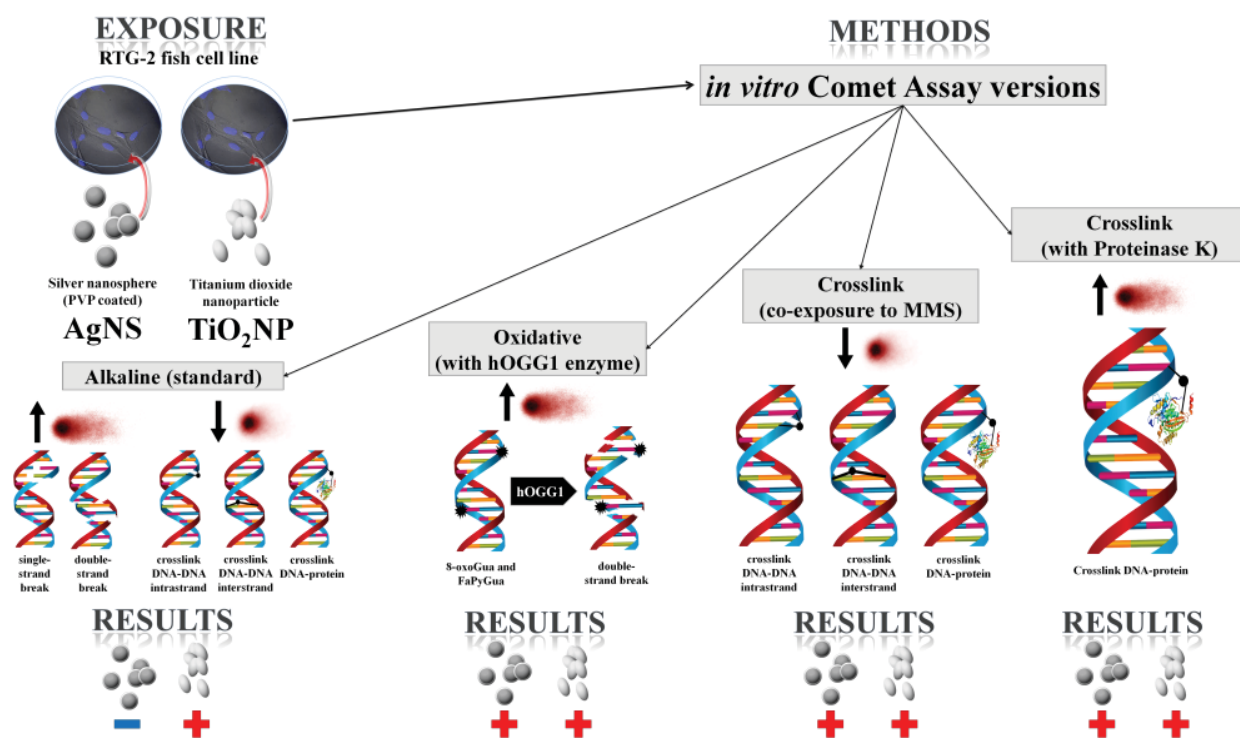
The first two authors participated equally in this research

¹ Genetics Department, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná State, Brazil.

² Chemistry Department, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná State, Brazil.

E-mail addresses: tati.klingel@gmail.com (Klingelfus, T.), disner.rodrigo@gmail.com (Disner G.R.), carmenluvoigt@yahoo.com.br, (Voigt C.L.), danielamoraismeme@gmail.com (Leme D.M.), margaces@gmail.com (Cestari M.M.).

*Corresponding author: Daniela Moraes Leme (Leme D.M.). Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Rua Francisco H. dos Santos, s/n, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba/PR-Brazil. Phone: +55 41 3361-1740. E-mail: daniela.leme@ufpr.br or danielamoraismeme@gmail.com



ABSTRACT

Nanotechnology has increased the production of nanomaterials (NMs) and therefore the prediction of their hazard for living organisms (*e.g.* fish) is a challenge to science. Within this context, the use of *in vitro* models based on fish cell lines pose ecotoxicological relevance, since the primary interaction between chemicals and life-forms starts at cellular levels. Thus, aimed at predicting the genotoxic mode of action (MoA) of NMs, RTG-2 cells (rainbow trout gonadal) were exposed to nano-silver (PVP-coated) and titanium and types/levels of DNA damages were assessed by the comet assay (standard alkaline, hOGG1-modified alkaline and two crosslink-modified alkaline versions). The present data shown that the use of standard alkaline comet assay alone may uncertain predict the genotoxicity of NMs, since oxidative and crosslink DNA damages were also verified in RTG-2 cells carrying out the modified versions of alkaline protocol. Moreover, we demonstrated that both nano-silver and titanium acted as DNA-protein crosslinkers through comet assay version with proteinase K. Evidence of nano-silver as crosslinker has been previous reported by us in an *in vivo* fish genotoxicity study and was now confirmed herein. Nano-silver and titanium are genotoxicants and thus may pose a risk to aquatic life. Furthermore, these findings attempt to the need for genotoxicity testing strategies that encompass the assessment of different types of DNA damages, in order to ensure an accurate prediction of the genotoxic potential of NMs.

Keywords: silver, titanium, *in vitro*, hOGG1, proteinase K, crosslink, genotoxicity.

Highlights:

- Nano-silver and titanium are DNA-protein crosslinkers.
- hOGG1 enzyme confirmed the oxidation type of DNA induced by nanomaterials.
- Different versions of comet assays can accurate predict NMs' genotoxicity.

INTRODUCTION

Nanotechnology offers several advantages to industries, due to the unique functional properties of nanometric materials, which differ from the bulk ones. Consequently, the development of new products on a large scale has increased. However, their special properties, such as the small size and large specific surface area, provide different behavior in the absorption, distribution, metabolism and excretion on organisms (Gaillet and Rouanet, 2015) and have also been a concern with respect to their safety for the environment and human health (Peters et al., 2014).

The nano-silver (Ag) and -titanium (TiO₂) are the most produced and used among nanomaterials (NMs). The global production of nano-Ag is more than 100 t/year and nano-TiO₂ more than 1,000 t/year. They are commonly used in consumer products, such as toothpaste, deodorants, shampoo, apparel, footwear, toys, washing machines, water purifiers, food and agricultural products, sunscreen, self cleaning window, among others (Marambio-Jones and Hoek, 2010; Cerkez et al., 2011; Peters et al., 2014; Stark et al., 2015). It has been listed in The Project on Emerging Nanotechnologies (2018) 442 nano-Ag and 14 nano-TiO₂ consumer products. For these reasons, the environment, specially the aquatic, ends up being the final destination of them.

Fish are the most diverse group of vertebrate into aquatic environments. Therefore, fish toxicity testing have been vastly used either for regulatory assessment of chemicals under legislation or academic studies that aimed to understand the ecological impacts of contaminants on aquatic ecosystems (Bols et al., 2005).

Alternatives to animal testing, such as fish cells (*in vitro* methods), have been used to ecotoxicological studies with the greatest benefit to mechanistic studies (Lillicrap et al., 2016). Moreover, the use of *in vitro* test as alternative method promotes the reduction of whole-fish in experiments, following the 3Rs' principle (Reduction, Refinement, and Replacement), a widespread goal of both scientists and society.

The main advantages to use *in vitro* methods are: cells present key features of all living creatures to comprehend unique and common mechanisms of toxicity; they can be maintained in controlled environment and for this reason the toxic mechanisms in molecular or cellular levels are assessed more easily; the toxicity evaluation is more fast and inexpensive, and at the same time many chemicals can be studied (Castanõ et al., 2003).

Available data about genotoxic mode of action (MoA) of NMs is still scarce. In nanogenotoxicology, most of the studies report only one genotoxic MoA of NMs, the oxidative damage in the DNA (Vevers and Jha, 2008; Hudecová et al., 2012; Rinna et al., 2015; Armand et al., 2016; Iglesias et al., 2017).

Recently, a different genotoxic MoA of nano-silver (Ag) (the same silver nanospheres with polyvinylpyrrolidone coating used in the present study) in DNA —DNA-DNA or DNA-protein crosslinks — was detected in blood and brain cell of *Hoplias intermedius* fish after trophic exposure (Klingelfus et al., 2017). The authors found a decreasing in the alkaline comet assay score that may be an evidence of crosslink genotoxic MoA. However, since NMs genotoxicity has still conflicting results, the hypothesis that there is other NMs MoA, such as crosslink in the DNA requires knowledge. Thus, the use of *in vitro* models based on fish cell lines and modified methods of the comet assay provide an efficient and fast way to study MoAs of NMs.

The comet assay can identify several types of DNA damages through modifications in the method (Koppen et al., 2017). The Guideline for the testing of chemicals *in vivo* mammalian alkaline comet assay of the OECD 489 (2014) recommends the alkaline comet assay to evaluate genotoxic effects, however, when particular damage need to be investigated, modifications in the method are recommended, such as used herein.

The first published method was the neutral comet assay that identifies double-strand breaks (Ostling and Johanson, 1984). In 1988, Singh and collaborators published the alkaline version, which unwound the DNA helix through alkaline treatment (pH > 13). Thus, several damages are detected by alkaline comet assay, such as both double and single-strand breaks, alkaline-labile sites, DNA-DNA and DNA-protein crosslinks (Fairbairn et al., 1995; Tice et al., 2000).

The crosslink DNA-DNA or DNA-protein can be confirmed by co-exposition of the chemical studied with a known clastogenic agent, like Methyl methanesulfonate (MMS) (Pfuhler and Wolf, 1996). The crosslinkers present radicals that form a covalent link with DNA or proteins (as the histones or larger proteins). This link prevents that fragments — caused by clastogenic agents — migrate in the gel of the alkaline comet assay (Costa, 1991). In relation to the consequences for the cell, the crosslink damage can prevent the separation of the strands to the replication and/or transcription processes (Noll et al., 2006). In order to distinguish between DNA-DNA and DNA-protein crosslinks, the proteinase K enzyme can be applied after lysis step, wherein breaks are created when there is linking among DNA, toxicant and protein, due to the proteins degradation, increasing the fragments of DNA in the comet tail (Merk and Speit, 1999).

Other modified method is the addition of endonuclease (FPG, ENDOIII and hOGG1) before the electrophoresis step to identify adducts and nucleotide oxidized that may promote breaks in the DNA strand. The hOGG1, used herein, identify 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), 2,6- diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPyGua), specifically (Smith et al., 2006).

The present study shows the hazard of nano-Ag and TiO₂ regarding their capacity of inducing different types of DNA damages, *i.e.* oxidative and crosslink, in low concentrations. For this purpose, standard alkaline comet assay, hOGG1- and two crosslink-modified alkaline versions were carried out using a gonad fish cell line [rainbow trout gonad cell line-2 (RTG-2)] exposed to Ag nanospheres with polyvinylpyrrolidone (PVP) coating (AgNS) or TiO₂ nanoparticles (TiO₂NP).

MATERIAL AND METHODS

Chemical characterization of the nanomaterial suspensions

The AgNS [20 nm average particle size, 20 µg/mL in water and PVP functionalized and TiO₂NP (anatase, nanopowder, < 25 nm particle size, 99.7% trace metals basis), all from Sigma-Aldrich[®], were used in this study. The choice of using commercial NMs allows the reproducibility of this study.

The concentration ranges of the tested NMs for the *in vitro* comet assay were determined based upon cytotoxicity assays, aiming to avoid false genotoxic results due to cytotoxic effects (data not shown). Thus, the final concentration ranges of each tested NMs were as follows: AgNS at 0.01, 0.1 and 1 µg/mL and TiO₂NP at 0.1, 1 and 10 µg/mL. Leibovitz's medium (L-15, Cultilab[®]) with fetal bovine serum (FBS, Gibco[®]) was used as the vehicle to prepare the TiO₂NP test suspensions. TiO₂NP was sonicated in the ultrasonic bath (60 Hz) for 30 min immediately before the exposure for dispersing particles and avoid aggregation. The AgNS suspension was not sonicated to not have interference in the PVP coating.

The stock suspensions (AgNS at 20 µg/mL in water and TiO₂NP at 50 µg/mL in L-15 medium with FBS) were analyzed by transmission electronic microscopy (TEM) and the work suspensions by Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) — under the same conditions of cell exposure to the tested NMs (in L-15 medium with FBS and within of time period 3 h) — to measure hydrodynamic size, zeta potential (ζ) and polydispersion index (PDI). To arrive at the % of polidispersivity (%PD), the following equation was used:

$$\%PD = \sqrt{PDI} \times 100.$$

Cell culture and treatment conditions

RTG-2 cells (obtained from European Collection of Cell Cultures UK, ECACC 90102529) were culture in L-15 medium supplemented with 10% FBS (Gibco®), 2 mM L-glutamine (Gibco®) and 1% Antibiotic (penicillin and streptomycin, Gibco®) at 22°C in a B.O.D. incubator. Subcultures were performed when the cells reached ~ 80% of confluence.

RTG-2 cells were seeded into 24-well plates (5×10^4 cells/well) and incubated at 22°C for 24 h. Thereafter, the cells were exposed to the test NMs' suspensions, excepted in the crosslink-modified alkaline version wherein the cells were co-exposed to the NMs with a known-genotoxic (Pfuhler and Wolf, 1996) [Methyl methanesulfonate (MMS) — CAS n°. 66-27-3, Sigma-Aldrich® — at 0.5 mM]. After 3 h of exposure, RTG-2 cells were harvest and the pellet obtained was carefully resuspended in the remain supernatant (~ 50 µL). 10 µL of these single cell suspensions were used to Trypan Blue Dye Exclusion Test, in order to verify the cell viability, which was higher than 80-90% of viable cells for all treatments (data not shown). The remaining cell suspensions were processed for the *in vitro* comet assay.

Ultrapure water at 10%-v/v final concentration was used as negative control, whereas MMS at 0.5 mM, hydrogen peroxide (H₂O₂) (Sigma-Aldrich®) at 50 µM (on the slide for 10 min) and formaldehyde (FA) — CAS n°: 50-00-0, Vetec® — at 3.3 mM were used as positive controls of standard alkaline comet assay, hOGG1- and crosslink-modified alkaline versions, respectively.

The experiments were performed using a single well/treatment and repeated three times.

In vitro comet assay

The standard alkaline comet assay, hOGG1-, crosslink- and proteinase K-modified alkaline versions were carried out according to Tice et al. (2000) and Leme et al. (2014); Reeves et al. (2008) and the manufacturer's protocol of hOGG1 enzyme (New England Biolabs); Pfuhler and Wolf (1996) and OECD 489 (2014); Merk and Speit (1999), respectively.

The single cell suspensions (50 µL) were resuspended in low-melting point agarose (LMP) [0.5% (w/v) in PBS] (120 µL) and spread on 1.5% agarose-coated slides. After agarose solidification at 4°C, the slides were immersed in a freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, 1% Na lauryl sacosine, pH 10; 1% Triton X-100 and 10% DMSO) for 2 h. The slides were then transferred to a horizontal electrophoresis tank filled with freshly electrophoresis buffer (200 mM EDTA; 10 M NaOH; pH > 13) at (4°C) for 25 min of DNA unwinding. Electrophoresis was carried out in the same buffer for 25 minutes at 300 mA, 1 V/cm. Afterward, the slides were neutralized with 4.85% Tris-HCl buffer (pH 7.5) for 15 min and dehydrated in 100% ethanol.

With respect to oxidative DNA damages, the hOGG1-modified alkaline version was carried out. After lysis, an additional step was carried out wherein the comet slides were washed — 3x 5 min — with enzyme buffer (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8). The slides were then incubated, in a moistened chamber, with hOGG1 (0.08 U/slide, Biolabs®, New England) for 30 min at 37°C. After that, the slides were washed in distilled water and submitted to electrophoresis as above described.

There were not additional steps to the crosslink-modified alkaline version slides.

For detecting the type of crosslink, *i.e.* DNA-DNA and DNA-protein, an additional step was carried out after lysis. The comet slides were washed — 3x 5 min — with TE-buffer [Tris (30 mM), EDTA (10 mM), SDS (1%), pH 8] and then incubated in a moistened chamber, with proteinase K (1mg/mL in TE-buffer) for 2 h at 37°C. After that, the slides were washed in distilled water and submitted to electrophoresis as above described.

The comet slides were stained with ethidium bromide (20 µg/mL, Sigma-Aldrich®) and analyzed under a fluorescence microscope (Axio Imager Z2, Carl Zeiss, Jena, DE), equipped with Metafer 4/VSlide automated capture software (Metasystems, Altussheim, DE). DNA lesions were quantified as DNA tail intensity (% DNA in tail) (Kumaravel et al., 2009) using the computer-based image analysis Metafer CometScan v.2.8.0® (Metasystems, Germany) on 100 randomly selected cells.

Statistical analysis

The difference among groups was tested by the Kruskal-Wallis test with a significance level of $p < 0.05$. Besides that, we consider significant only when the difference with negative control was higher than 2x. Fold-change was calculated through ratio of tail intensity between treatments and concurrent negative controls, as follow: alkaline version – cells cultured in L-15 medium; oxidative version – cells cultured in L-15 medium with hOGG1 posttreatment; crosslink version – cells exposed to MMS at 0.5 mM; DNA-protein crosslink version – cells cultured in L-15 medium with proteinase K posttreatment. The statistical level was set at $2 < \text{Fold-change} < 0.5$ for increasing or decreasing of tail intensity in relation to the concurrent negative control.

RESULTS AND DISCUSSION

AgNS and TiO₂NP have heterogeneity of particles size and non-genotoxic effects are observed by standard alkaline comet assay

The NMs tested showed to be unstable in culture medium according to chemical characterization, being the zeta potential values around $-30 \text{ mV} < \zeta < +30 \text{ mV}$ and polydispersity index $> 20\%$ (Table 1). TEM images of AgNS and TiO₂NP stock suspensions showed aggregated particles (size of each particle in Figs. 1A1 and 1B1; size of particles' aggregated in Fig. 1A2 and Fig. 1B2, respectively). In general, the analysis of hydrodynamic size of AgNS (Fig. 1A3) and TiO₂NP (Fig. 1B3) had a size range (particle diameter) of 9.25 to 4675.00 nm; and 5.92 to 316.90 nm, respectively.

In relation to the particle size, there are many pathways in which NMs can disrupt the plasmic membrane for further being uptaken by the cell and therefore reaching the cytosol. In non-phagocytic cells, such as gonadal cells, the main pathways are pinocytosis or direct penetration. NMs smaller than 120 nm can release clathrin-mediated, caveolin-mediated or clathrin/caveolin independent endocytose. Duo to the heterogeneity of particles size, they may be targeting the cytosol by different pathways (Zhu et al., 2012).

Table 1. Characterization of the nanomaterials' (NMs) suspensions in relation to Zeta potential (mV) and % of polydispersity. The values of each suspension were measure on Zetasizer[®] Nano Series ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) in the same exposure conditions. Suspensions: (AgNS) Silver nanosphere polyvinylpyrrolidone coated in L-15 culture medium at 0.01, 0.1 and 1 $\mu\text{g/mL}$ exposure concentrations; (TiO₂NP) Titanium dioxide nanoparticles in L-15 culture medium at 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$ exposure concentrations. Instability of the suspensions are considered when Zeta potential $> -30 \text{ mV}$ or $< +30 \text{ mV}$; Polidispersivity $> 20\%$ indicate heterogeneous suspensions in relation to the particle sizes.

Nanomaterials	Suspension ($\mu\text{g/mL}$)	Zeta potential (mV)	Polydispersity (%)
AgNS	0.01	-6.56	62.27
	0.1	-7.46	66.93
	1	-7.46	91.54
TiO ₂ NP	0.1	-1.03	66.60
	1	-7.82	93.86
	10	-6.70	93.86

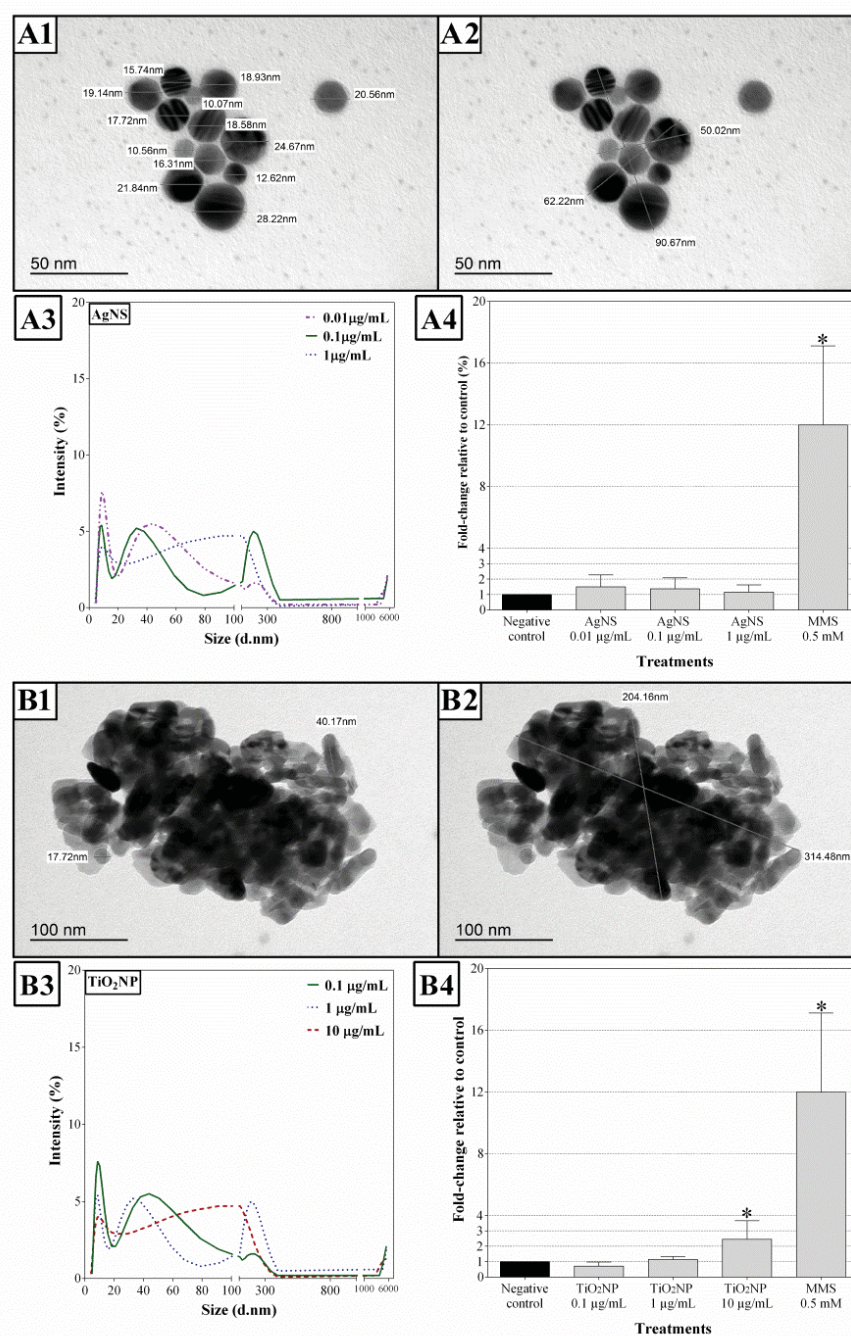


Figure 1. Transmission electronic microscopy (TEM) images, size distribution and standard comet assay of the AgNS and TiO₂NP suspensions. Non-detection of genotoxicity by standard comet assay in AgNS concentrations. [A1-A2] TEM of AgNS stock suspension (20 µg/mL in water); [A3] Size particle distribution of AgNS in L-15 culture medium at 0.01, 0.1 and 1 µg/mL exposure concentrations; [A4] Fold-change relative to control (solvent control 10%-v/v final concentration) of RTG-2 cells exposure to AgNS concentrations. [B1-B2] TEM of TiO₂NP stock suspension (50 µg/mL in L-15 culture medium); [B3] Size particle distribution of TiO₂NP in L-15 culture medium at 0.1, 1 and 10 µg/mL exposure concentrations; [B4] Fold-change relative to control (solvent control 10%-v/v final concentration) of RTG-2 cells exposure to TiO₂NP concentrations. MMS: Methyl methanesulfonate at 0.05mM – positive control. Fold-change values were expressed with mean and standard deviation; * differences were considered significance when values < 0.5 or > 2.

Furthermore, the NMs internalization into cell nucleus is also possible since the vertebrates nuclear pore or nuclear pore complex (NPC) present about 80 to 120 nm in diameter and its proteins modulate the molecules input or output into nucleus (Alber et al., 2007). In our study, despite a high diversity particle sizes was observed to all tested NMs in the final culture medium, a considerable amount of particles smaller than 120 nm was observed, being associated with cell uptake.

In relation to genotoxic effects, we firstly analyzed the genotoxicity of the tested NMs by the standard alkaline comet assay, the same method used by *in vivo* experiments (Klingelfus et al., 2017), which detects several types of DNA damages. Both increase and decrease of tail intensity can indicate genotoxicity (Tice et al., 2000). According to the authors previously mentioned, there is increase of the tail intensity when double- and single-strand breaks and/or alkaline-labile sites happened. In contrast, the tail intensity decreases in relation to the negative control for damage of DNA-DNA and DNA-protein crosslinks. The decreased migration of fragments in the tail happens due to the increase the size of DNA fragments, such as DNA-DNA interstrand crosslink that produces bigger fragments with double-strand DNA; DNA-DNA intrastrand crosslink produces bigger fragments with single-strand DNA; and with DNA-proteins crosslink that increases the fragment size when link with histones or larger proteins (Klaude et al., 1996; Merk and Speit, 1999). Chemicals can cause different DNA lesions at the same time, for example in the study of Hartmann co-worker (1995) about genotoxicity assessment of cyclophosphamide, which in order to obtain a positive result in the comet assay, the cells had to be exposed to a concentration 100 times higher than the one used in the sister chromatid exchange test, since the cyclophosphamide is a crosslinker that could prevented the migration of DNA fragments in the alkaline comet assay.

In the present study, genotoxic effects in the standard alkaline comet assay version were observed only to the TiO₂NP (Fig. 1B4) at 10 µg/mL, with tail intensity increased in relation to the control. The same effect was not observed in the AgNS treatments, wherein there were no differences in relation to the control (Fig. 1A4). The increase of the DNA fragment size caused by crosslink can have prevented the migration of DNA fragments, showing a negative result to the standard comet assay.

To explain the negative results found in standard comet assay and to confirm the *in vivo* genotoxic responses mentioned previously by Klingelfus et al. (2017), it was required other genotoxicity tests, such as the modifications in the alkaline comet assay cited below, which detect specific damage.

hOGG1 confirm the DNA oxidation caused by AgNS and TiO₂NP with 8-oxoGua and FaPyGua generation specifically

The presence of oxidized bases is a specific indicator of oxidative attack to DNA and a simple modification of the alkaline comet assay, incorporating a digestion of DNA with a lesion-specific endonuclease (*e.g.* hOGG1), allows the quantification of oxidative DNA damages. The tested NMs were able to oxidize DNA bases in a concentration response manner with significant values at the two highest tested concentrations (both AgNS and TiO₂NP at 1 and 10 µg/mL) (Fig. 2).

Many studies report the oxidative DNA damage by NMs and most of them are in human cells with FPG modified comet assay (Petković et al., 2011; Kermanizadeh et al., 2012; Kruszewski et al., 2013; Huk et al., 2014; Vales et al., 2015; Armand et al., 2016; Iglesias et al., 2017). The method using FPG endonuclease identifies many damages, as 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPyGua) and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FaPyAde), AP sites and ring-opened N7 guanine adducts (Karakaya et al., 1997; Speit et al., 2004; Dusinska and Collins 2008). In contrast, the method with hOGG1 identifies only 8-oxoGua and FaPyGua (Smith et al., 2006). Both Hudecová et al. (2012) and Rinna et al. (2015) studies demonstrated oxidative DNA damage through hOGG1 modified comet assay after 30 minutes of exposition of silver nanoparticles at 1, 25 and 100 µg/ml in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and human epithelial embryonic (EUE) cells, respectively. In RTG-2 fish cells was found oxidative DNA damage (using FPG endonuclease) after exposure to TiO₂ nanoparticles at 50 µg/ml combined with UVA irradiation (Vevers and Jha, 2008). Hence, we can corroborate the data reported in the literature about oxidative MoA in the DNA, since the AgNS and TiO₂NP of our study promoted the alterations in the DNA through nitrogenous bases oxidation, modifying guanine in 8-oxoGua or FaPyGua.

AgNS and TiO₂NP are DNA-protein crosslinkers

The present study has proven that NMs are crosslinkers, acting via DNA-protein interactions. Recently, Klingelfus et al. (2017) and Cimbaluk et al. (2018) suggested the crosslink MoA after acute and subchronic exposure of fish to nano-Ag and carbon nanotubes, respectively. Both authors used the standard alkaline comet assay and observed the decreasing of comet assay score, which indicates the crosslink DNA damage however does not discriminate if it is DNA-DNA or DNA-protein crosslink. For this reason, we used modifications in comet assay that showed the type of crosslink, such as the following results.

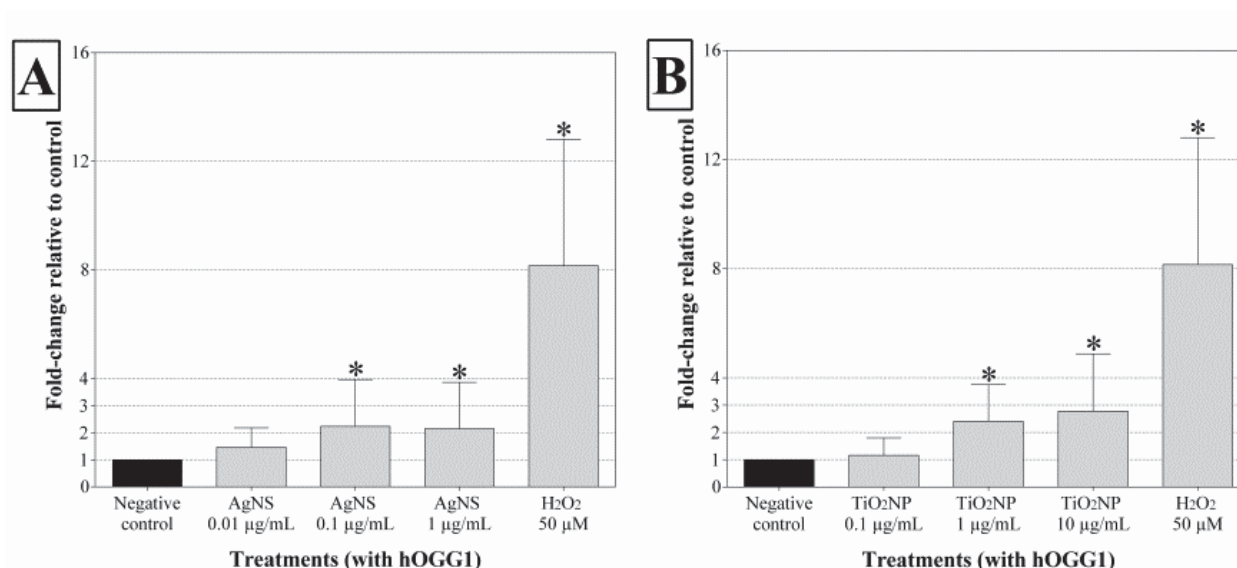


Figure 2. Oxidative alkaline comet assay version with hOGG1 enzyme in RTG-2 cells exposed to AgNS and TiO₂NP suspensions. Fold-change relative to control (with hOGG1) of RTG-2 cells exposure to [A] AgNS and [B] TiO₂NP concentrations. H₂O₂: Hydrogen peroxide 50 µM – positive control. Fold-change values were expressed with mean and standard deviation; * differences were considered significance when values > 2.

DNA crosslinkers can be detected using a modified protocol of the alkaline comet assay developed by Pfuhrer and Wolf (1996). The protocol is based on a combined treatment with a DNA damaging agent and a crosslinker (*e.g.* formaldehyde) followed by measurements of % DNA in tail. Crosslinkers cause a reduction of mutagen-induced DNA migration after combined treatment. We used the method described by Pfuhrer and Wolf (1996) to assess the crosslink potential of NMs. RTG-2 cells were co-exposed to MMS (clastogenic agent) and tested NMs, wherein reduction of MMS-induced DNA migration indicates the crosslink potential of both AgNS and TiO₂NP. The tested NMs decreased the % of DNA in tail, but significant values were only observed in the highest concentrations, such as AgNS (Fig 3A1) at 1 µg/mL and TiO₂NP (Fig 3B1) at 10 µg/mL.

Once proved that the AgNS and TiO₂NP are crosslinkers, another modified version of the alkaline comet assay based on proteinase K was carried out in order to verify whether the NMs are DNA-DNA or DNA-protein crosslinkers (Merk and Speit, 1999). The increased DNA migration showed the presence of DNA-protein crosslink with significant values in all tested concentrations of both AgNS (Fig. 3A2) and TiO₂NP (Fig. 3B2). The increasing of the tail intensity concentration-dependent was not observed and all the concentrations had the same response. It may mean that NMs seem to have behaved similarly and caused damage in any concentration probably due to a wide particle size range distribution similarly found.

Thus, herein these genotoxicity biomarker alterations and the characterization analysis – showing very small NM sizes – could evidence the internalization of AgNS and TiO₂NP into RTG-2 cells and their nuclei.

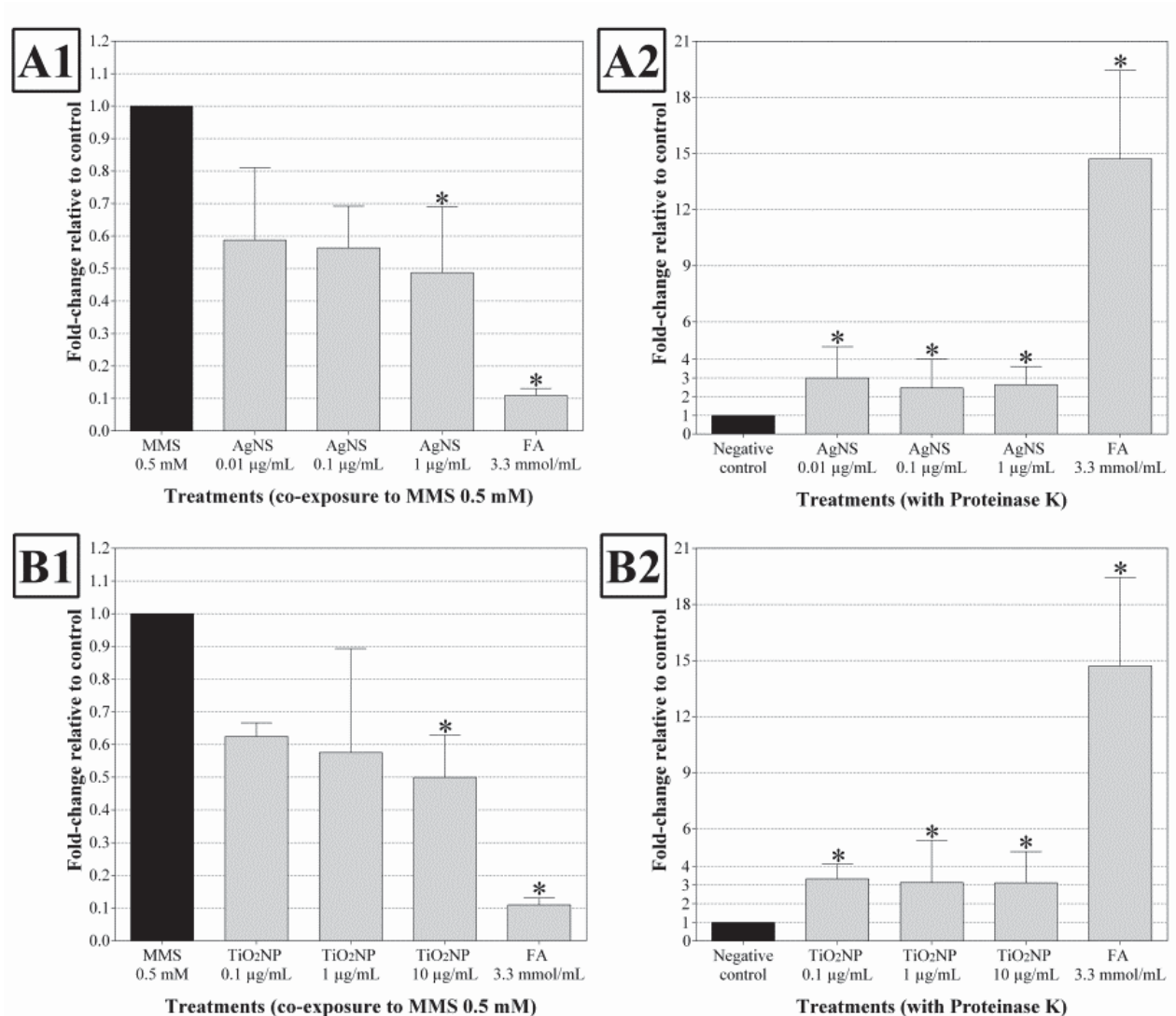


Figure 3. Crosslink alkaline comet assay versions in RTG-2 cells exposed to AgNS and TiO₂NP suspensions: 1) co-exposure between nanomaterial (NM) and known-clastogenic agent [Methyl methanesulfonate (MMS)]; 2) with proteinase K enzyme to discriminate the type of crosslink (DNA-DNA or DNA-protein). Fold-change relative to control (MMS) of RTG-2 cells exposure to [A1] AgNS + MMS and [B1] TiO₂NP + MMS concentrations. FA + MMS: co-exposure of Formaldehyde 3.3 mmol/mL and Methyl methanesulfonate (MMS) at 0.5 mM – positive control. Fold-change relative to control (with proteinase K) of RTG-2 cells exposure to [A2] AgNS and [B2] TiO₂NP concentrations. FA: Formaldehyde 3.3 mmol/mL (with Proteinase K) – positive control. Fold-change values were expressed with mean and standard deviation; * differences were considered significance when values < 0.5 or > 2.

CONCLUSION

The findings obtained from the standard alkaline comet assay was not enough to estimate their genotoxicity, since the NMs tested herein showed both indirectly (oxidative damage) and directly (DNA-protein crosslink) genotoxicity. Thus, the standard comet assay (alkaline version) — which is commonly used in genotoxicity test batteries — may not accurately predict the genotoxicity of NMs, leading to uncertainties about their hazard.

Both nano-Ag and -TiO₂ had the same behavior in relation to DNA damage and the unpredictability in NMs behavior may be due to the fact of particle agglomeration in suspension. However, if the agglomerates have a size range up to 120 nm, the particle internalization in both cytoplasm and nucleus is possible, leading to genotoxic effects.

Therefore, our study shows that NMs may pose a risk to living organisms, particularly fish, and the variations in the comet assay methods — as hOGG1- and two crosslinking-modified versions shown herein — should be accomplished in order to accurately predict the genotoxicity of NMs. In other words, to predict the risk of NMs is needed more detailed analyses and not only conventional methods.

Acknowledgments

We thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil) for their financial support; Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR, for the TEM images; Centro Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal do Setor de Ciências Biológicas – UFPR, for the use of the equipment purchased with Pro-Equipment (CAPES) and Pro-Infra (FINEP); and Academic Publishing Advisory Center (Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica, CAPA - www.capa.ufpr.br) of the Federal University of Paraná for assistance with English language editing.

REFERENCES

- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L.M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B.T., Sali, A., Rout, M.P., 2007. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450, 695–701.
- Armand, L., Tarantini, A., Beal, D., Biola-Clier, M., Bobyk, L., Sorieul, S., Pernet-Gallay, K., Marie-Desvergne, C., Lynch, I., Herlin-Boime, N., Carriere M., 2016. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. *Nanotoxicology* 10(7), 913–23.
- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., Schirmer, K., 2005. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology*. *Biochem. Mol. Biol. Fishes* 6, 43–84.
- Castañó, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Kawahara, K., Lee, L.E.J., Mothersill, C., Pärt, P., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., 2003. The Use of Fish Cells in Ecotoxicology 317–351.
- Cerkez, I., Kocer, H.B., Worley, S.D., Broughton, R.M., Huang, T.S., 2011. Multifunctional Cotton Fabric : Antimicrobial and Durable Press. *Journal of Applied Polymer Science* 124, 4230–4238.
- Cimbaluk, G.V., Ramsdorf, W.A., Perussolo, M.C., Santos, H.K.F., Da Silva De Assis, H.C., Schnitzler, M.C., Schnitzler, D.C., Carneiro, P.G., Cestari, M.M., 2018. Evaluation of multiwalled carbon nanotubes toxicity in two fish species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.034>
- Costa, M., 1991. DNA-protein complexes induced by chromate and other carcinogen. *Environmental Health Perspectives* 92, 45–52.
- Dusinska, M., and Collins, A.R., 2008. The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23(3), 191–205.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 339(1), 37–59
- Gaillet, S., and Rouanet, J.-M., 2015. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms — A review. *Food and Chemical Toxicology* 77, 58–63.
- Hartmann, A., Herkommer, K., Glück, M., Speit, G., 1995. DNA-Damaging Effect of Cyclophosphamide on Human Blood Cells *In vivo* and *In vitro* Studied With the Single-Cell Gel Test (Comet Assay). *Environ. Mol. Mutagen.* 87, 180–187.
- Hudecová, A., Kusznierevich, B., Rundén-pran, E., Magdolenová, Z., Hašplová, K., Rinna, A., Fjellsbø, L.M., Kruszewski, M., Lankoff, A., Sandberg, W.J., Refsnes, M., Skuland, T., Schwarze, P., Brunborg, G., Bjørås, M., Collins, A., Miadoková, E., Gálová, E., Dušinská, M., 2012. Silver nanoparticles induce premutagenic DNA oxidation that can be prevented by phytochemicals from *Gentiana asclepiadea*. *Mutagenesis* 1–11.

- Huk, A., Izak-nau, E., Reidy, B., Boyles, M., Duschl, A., Lynch, I., Du, M., 2014. Is the toxic potential of nanosilver dependent on its size? Part. Fibre Toxicol. 11, 1–16.
- Iglesias, T., López de Cerain, A., Irache, J.M., Martín-Arbella, N., Wilcox, M., Pearson, J., Azqueta, A., 2017. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. Int. J. Pharm. 517, 67–79.
- Karakaya, A., Jaruga, P., Bohr, V.A., Grollman, A.P., Dizdaroglu, M., 1997. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein. Nucleic Acids Res. 25, 474–479.
- Kermanizadeh, A., Gaiser, B.K., Hutchison, G.R., Stone, V., 2012. An *in vitro* liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. Part. Fibre Toxicol. 9, 1–13.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrijm, G., 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutat. Res. 363, 89–96.
- Klingelfus, T., Lirola, J.R., Oya Silva, L.F., Disner, G.R., Vicentini, M., Nadaline, M.J.B., Robles, J.C.Z., Trein, L.M., Voigt, C.L., Silva de Assis, H.C., Mela, M., Leme, D.M., Cestari, M.M., 2017. Acute and long-term effects of trophic exposure to silver nanospheres in the central nervous system of a neotropical fish *Hoplias intermedius*. NeuroToxicology 63, 146–154.
- Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A.R., Langie, S.A.S., 2017. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. Mutagenesis 0, 1–12.
- Kruszewski, M., Gradzka, I., Bartłomiejczyk, T., Chwastowska, J., Sommer, S., Grzelak, A., Zuberek, M., Lankoff, A., Dusinska, M., Wojewódzka, M., 2013. Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles. Toxicol. Lett. 219, 151–159.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N., 2009. Comet assay measurements: a perspective. Cell Biology and Toxicology 25, 53–64.
- Leme, D.M., de Oliveira, G.A.R., Meireles, G., dos Santos, T.C., Zanoni, M.V.B., de Oliveira, D.P., 2014. Genotoxicological assessment of two reactive dyes extracted from cotton fibres using artificial sweat. Toxicol. Vitro. 28, 31–38.
- Lillicrap, A., Belanger, S., Burden, N., Pasquier, D. Du, Embry, M.R., Halder, M., Lampi, M. a., Lee, L., Norberg-King, T., Rattner, B. a., Schirmer, K., Thomas, P., 2016. Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: A review of developments over the last 2 decades and current status. Environ. Toxicol. Chem. 35, 2637–2646.
- Marambio-Jones, C., and Hoek, E.M.V., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research 12, 1531–1551.
- Merk, O., and Speit, G., 1999. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. Environmental and molecular mutagenesis 33, 167–172.

- Noll, D.M., Mason, T.M., and Miller, P.S., 2006. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chemical reviews* 106(2), 277–301.
- OECD, 2014. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. Series on Guideline for the testing of chemicals, TG 489. OECD Publishing.
- Ostling, O. and Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123(1), 291–298.
- Peters, R., Brandhoff, P., Weigel, S., Marvin, H., Bouwmeester, H., Aschberger, K., Rauscher, H., Amenta, V., Arena, M., Botelho, F., Gottardo, S., Mech, A., 2014. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. EFSA Support. Publ. 125.
- Petković, J., Žegura, B., Stevanović, M., Drnovšek, N., Uskoković, D., Novak, S., Filipić, M., 2011. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology* 5, 341–353.
- Pfuhler, S., and Wolf, H.U., 1996. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 27, 196–201.
- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1109.
- Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F., Jha, A.N., 2008. Hydroxyl radicals (•OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation research*, 640(1-2), 113–22.
- Rinna, A., Magdolenova, Z., Hudecova, A., Kruszewski, M., Refsnes, M., Dusinska, M., 2015. Effect of silver nanoparticles on mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage. *Mutagenesis* 30, 59–66.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Smith, C.C., Donovan, M.R.O., and Martin, E.A., 2006. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDIII. *Mutagenesis* 21(3), 185–190.
- Speit, G., Schütz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., Hoffmann, H., 2004. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol. Lett.* 146, 151–158.
- Stark, W.J., Stoessel, P.R., Wohlleben, W., Hafner, A., 2015. Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 44, 5793–5805.
- The Project on Emerging Nanotechnologies. <http://www.nanotechproject.org/cpi> (accessed 18.01.20).
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel / Comet Assay : guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(3), 206–221.

- Vales, G., Rubio, L., and Marcos, R., 2015. Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation , but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology* 9(5), 568–78.
- Vevers, W.F., and Jha, A.N., 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells *in vitro*. *Ecotoxicology (London, England)* 17(5), 410–20.
- Zhu, M., Nie, G., Meng, H., Xia, T., Nel, A., Zhao, Y., 2012. Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. *Accounts Chemical Res.* 46, 622–631.

CAPÍTULO

IV

SOBRE A QUESTÃO AMBIENTAL:

SOBRE OS ASPECTOS SOCIAIS DA CRISE AMBIENTAL E AS IMPLICAÇÕES DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL NA SAÚDE COLETIVA*

Geonildo Rodrigo Disner

RESUMO

A questão ambiental tem como foco central o colapso dos ecossistemas em função da exploração exagerada dos recursos naturais e manejo insustentável desses. Trata-se de uma crise de civilização, onde apenas uma quebra de paradigma em relação ao modelo econômico e direitos humanos pode solucionar essa complexa questão. A preservação ambiental, tanto no contexto prático quando histórico deve ser constantemente discutida e aprimorada na busca de soluções para os impasses do mundo moderno. O desenvolvimento voltado a sustentabilidade é a melhor alternativa na promoção do aumento da qualidade de vida e o incremento das capacidades humanas. A interligação e propostas multidisciplinares envolvendo a tridimensionalidade da sustentabilidade (ecológica-econômica-social) pode ser uma ferramenta efetiva na elaboração e discussão de propostas para a questão ambiental.

Palavras chave: Sustentabilidade; Conservação; Questão ambiental; Sociedade.

INTRODUÇÃO

A preservação ambiental tem se tornado, tanto na academia quanto na sociedade, um tema em constante interesse. Atualmente, a discussão ambiental mobiliza cientistas, ativistas e pessoas engajadas com a conservação da biodiversidade, sendo vista como um movimento que se preocupa tanto com a vitalidade do meio ambiente e preservação dos recursos naturais quanto expressa a preocupação sobre os problemas que a falta de um desenvolvimento sustentável adequado pode trazer para a qualidade de vida do ser humano.

Os graves problemas acerca da destruição e poluição dos ambientes naturais, com alteração da sua dinâmica e equilíbrio, podem ser facilmente vistos nas recorrentes crises que as sociedades -especialmente urbanas- vem sofrendo, a exemplo da crise hídrica e da gestão de resíduos. Tais implicações se devem ao caráter colonial do Brasil, mesmo após 193 anos de independência. A tendência visionária européia continua recorrente nas práticas de exploração dos recursos. Desde sempre, as terras desta nação foram vistas como estoque e como uma despesa. Como aponta Rui Erthal (2000), o Brasil colonial fora estabelecido na grande propriedade monocultora e exportadora com base na mão de obra escrava, onde a expansão do mercado mundial e intenso

* **Nota do autor:** Artigo publicado nos Anais da IX Jornada de Sociologia da Saúde de 2015, realizada em Curitiba/PR pelo Grupo de Pesquisa em Sociologia da Saúde e Programa de Pós-Graduação em Sociologia da UFPR. ISSN: 1982-5544. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.humanas.ufpr.br/portal/sociologiasaude/files/2016/04/ART-10-SOBRE-OS-ASPECTOS-SOCIAIS-DA-CRISE-AMBIENTAL-E-AS-IMPLICA%C3%87%C3%95ES-DO-DE.pdf>.

colonialismo proporcionou a acumulação de capital, sendo decisiva para a formação do capitalismo num grupo de países do ocidente europeu.

A maioria dos relatos dos cronistas e viajantes da era colonial, a exemplo do primeiro texto documentado na história deste país através da carta de Pero Vaz de Caminha à D. Manoel dentre outros escritos posteriores, eram focadas em dois pontos principais: um relativo ao conhecimento, onde buscava-se classificar e organizar o mundo novo à moda europeia. O outro, atendia pragmaticamente aos interesses econômicos do colonizador, buscando uma utilidade daquele universo selvagem e incompreensível (URBAN, 2011 p.36). As duas questões se sobrepuseram rapidamente e, ao longo dos séculos, foram responsáveis pela progressiva destruição do patrimônio natural brasileiro.

Nesse contexto, emerge a crescente importância das questões éticas e ecológicas envolvendo a relação homem-natureza, além da recorrente e contemporânea discussão sobre sustentabilidade nas relações sociais e ambientais. O discurso baseado na necessidade dos recursos naturais é justificado e bem estabelecido, resta agora buscarmos atualização das ideias de como promover a conservação ambiental respeitando a dignidade e direitos humanos ao acesso dos recursos naturais de forma igualitária e racional.

DEBATE HISTÓRICO SOBRE A QUESTÃO AMBIENTAL

A preocupação com a questão ambiental relacionada com a evolução social se mescla entre os séculos XVIII e XIX. O primeiro trabalho crítico foi publicado, de forma anônima, por Thomas Malthus, em 1798. No ensaio '*An Essay on the Principle of Population*' o influente intelectual britânico expôs suas ideias e preocupações acerca do crescimento da população no planeta. Na teoria criada- Teoria Populacional Malthusiana- Malthus precava que a produção de alimentos crescia em escala aritmética enquanto a população seguia em crescente geométrica. O clérigo inclusive sugeria algumas medidas como ter menos filhos entre os casais como uma forma de atenuação do problema. No caso da população humana, poderiam ser dispositivos de controle demográfico tanto a peste, a fome ou guerra. Na falta desses três elementos, haveria fatalmente uma expansão demográfica desenfreada. Na Europa, nessa época a vida nas cidades tornou-se mais importante que a vida no campo e o trabalho artesanal foi sendo substituído por métodos mecânicos e mais rápidos. Isso trouxe muitas consequências negativas, nas cidades os habitantes e trabalhadores moravam em condições precárias e conviviam diariamente com a falta de higiene, sem contar com o constante medo do desemprego e da miséria. Refletindo, certamente, sobre as estruturas das relações com o capital ainda presentes no mundo contemporâneo.

O debate sobre a problemática ambiental emergiu após a Segunda Guerra Mundial, alavancando importantes mudanças na visão do mundo. Os frequentes testes nucleares e explosões de bombas atômicas despertaram os primeiros grupos ambientalistas, devido à preocupação com a magnitude do desenvolvimento de armas que poderiam ter efeitos catastróficos sobre o ambiente, além de risco a dignidade da vida humana. Após a grande guerra a Organização das Nações Unidas foi instituída e passou a ter um papel fundamental nas discussões sociais, políticas e ambientais a nível global, além de seu papel no incentivo da paz e prevenção de conflitos. Nesse panorama, o livro e denúncia no trabalho inédito de Rachel Carson, chamado *Primavera Silenciosa* (1962) fortalece as revelações sobre as irresponsabilidades no cuidado com o ambiente. Nessa época as indústrias químicas liberavam inseticidas e compostos sintéticos sem conhecimento científico ou precaução, sendo que as indústrias químicas, têxteis e de transporte poluíam indiscriminadamente e as fumaças expelidas pelas chaminés representavam o desenvolvimento. A revolta quanto a isso fortaleceu os movimentos pró-ambiente e os estudos científicos cada vez mais frequentes apontando para as consequências da destruição do ambiente forneceram o embasamento para o tema.

Movido pelo ímpeto de propriedade irracional sobre a natureza, o ser humano desencadeou diversos processos que resultaram, dentre outros, na desertificação, na degradação da fertilidade do solo, na destruição da camada de ozônio, na poluição dos ecossistemas, no desaparecimento de espécies animais e vegetais, na concentração elevada de gases tóxicos na atmosfera e nas alterações climáticas, todos esses processos acompanhados e agravados pelo crescimento exponencial da população humana (LOVATTO, 2011).

A consciência ambiental surgiu através da percepção de finitude dos recursos naturais e que seu uso indevido e imprudente pode representar sérios problemas. Dessa forma, ciência e tecnologia passaram a ser mais frequentemente questionadas. A crise ambiental moderna se consolida no final da década de 60 e início da década de 70 com a necessidade e iminente (re)discussão do desenvolvimento e “progresso”, devido as perturbações destes sobre a natureza externa. Nessa época muitos livros e artigos foram publicados além de diversos encontros debateram a problemática da crise ambiental.

Neste cenário, na década de 70, uma importante corrente de pensamento é apresentada pelo filósofo e ecologista Norueguês Arne Naess, a Ecologia Profunda. A ecologia profunda aflora no ser humano o sentido do ‘ser’ parte do todo e da necessidade de viver em equilíbrio com este todo, respeitando todas as formas de vida. Nessa ideologia, faz-se fundamental a percepção da importância de cada parte do todo e do todo como algo maior que a soma das partes. Isso acontece porque a ecologia profunda aflora de uma forma positiva a percepção ambiental do indivíduo,

manifestando-se a partir de uma tomada de consciência do ser humano pelo ambiente, e é expressa pela maneira como ele percebe o ambiente em que está localizado, aprendendo a integrá-lo e protegê-lo como extensão do seu próprio corpo. Essa é a concretização teórica oposta a “ecologia rasa”, baseada na dicotomia cartesiana homem X natureza.

A pressão popular organizada e o real enfrentamento de riscos ambientais culminam na primeira grande discussão sobre desenvolvimento sustentável e da importância ambiental com a Conferência das Nações Unidas sobre o Homem e o Meio Ambiente, chamada conferência de Estocolmo, no ano de 1972. Nela emergiram as contradições ligadas ao desenvolvimento e ao meio ambiente. Estudos demonstravam uma série de impactos ambientais de âmbito internacional, provocados pelo modelo de desenvolvimento capitalista instituído. O molde “desenvolvimento zero” que foi proposto a fim da estagnação total do crescimento econômico como forma de impedir tragédias ambientais de grandes proporções no mundo não agradou os dirigentes de diversos países, especialmente os colonizados e subdesenvolvidos que almejaram obter desenvolvimento a fim de garantir melhor qualidade de vida às suas populações, ou de alguma forma alcançar as grandes potências mundiais. A conferência ficou marcada pela disputa e impasse do “desenvolvimento zero”, defendido pelos países desenvolvidos; e o “desenvolvimento a qualquer custo”, defendido pelos países do Sul.

Nesse crescente avanço da discussão e pensamento em favor de melhores condições ecológicas, e até mesmo como fruto dos encontros entre governantes de todo o globo, a Organização das Nações Unidas instituiu em 1983 a Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, sendo os principais objetivos dessa reexaminar as questões críticas relativas ao meio ambiente e reformular propostas realísticas para abordá-las; além de propor novas formas de cooperação internacional nesse campo de modo a orientar as políticas e ações no sentido de fazer as mudanças necessárias e auxiliar as sociedades e governos na compreensão dos problemas existentes, dando suporte e incentivo para as atuações.

Em 1987, a comissão da ONU publicou a declaração “Nosso futuro comum” (Relatório Brundtland), onde propõe a integração da questão ambiental no desenvolvimento econômico. Sendo sugeridas medidas universais a serem consideradas, dentre elas: limitar o crescimento populacional, garantir a alimentação em longo prazo, preservar a biodiversidade e ecossistemas, diminuir o consumo de energia e promover o desenvolvimento de tecnologias com o uso de fontes energéticas renováveis e ecologicamente adaptadas.

Em seguida, o conceito de desenvolvimento sustentável ganhou uma amplitude maior com a Conferência da ONU sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (Conferência Rio-92), sediada na cidade do Rio de Janeiro. Pode parecer que a lacuna de duas décadas entre os encontros não

tenha alterado efetivamente muito dos padrões adotados pelas economias ao redor do mundo, porém muitos avanços nos conhecimentos e discussões permitiram a redação e aprovação da *Agenda 21*, documento que estabelece um pacto pela mudança do padrão de desenvolvimento global para o próximo século. Trata-se de um plano de ação voltado a um planeta mais sustentável, com diversos capítulos abrangendo variados obstáculos, sugerindo que os delegados considerem a implementação dos acordos e resultados alcançados nas cúpulas de desenvolvimento sustentável e que, principalmente, uma economia sustentável inserida no contexto de desenvolvimento e erradicação da pobreza seja implementada. As convenções e acordos buscam estimular as mudança dos atuais padrões para um modelo de desenvolvimento que privilegie o equilíbrio ambiental e a justiça social (BRASIL-MMA, 2007). A *Agenda 21* não consolida apenas uma quebra de paradigma em relação aos padrões de crescimento e de desenvolvimento, mas indica a necessidade de se reinterpretar o conceito de progresso para além dos tradicionais indicadores pertinentes ao sistema de contas nacionais. Em 2012, no encontro Rio+20 os conferencistas representando aproximadamente 190 nações discutiram e renovaram o compromisso político com o desenvolvimento sustentável, algumas mudanças foram propostas, sobretudo, no modo como estão sendo usados os recursos naturais, além de aspectos relacionados a questões sociais como a miséria e falta de moradia. Esses contínuos eventos são importante no direcionamento e estabelecimento de diretrizes acertadas em escala global, devido a problemática ambiental não ser restrita aos limites geográficos territoriais, mas sim um assunto concernente a coletividade.

O TRIPÉ DA SUSTENTABILIDADE

A ideia de um desenvolvimento racional e equilibrado avança adquirindo robustez e força quando passa a abranger e interligar diferentes frentes que incluem a sustentabilidade ecológica, econômica e social. De modo que é facilitado alcançar os objetivos individuais quando todos os setores forem favorecidos e levados em consideração.

A sustentabilidade ecológica preza, principalmente, pela conservação da natureza e preservação da biodiversidade. Haja visto que a dimensão ambiental está condicionada às dimensões culturais, sociais, econômicas e políticas. A crise ambiental é, portanto, a consequência de um conjunto de ações danosas que a espécie humana vem causando ao longo de sua existência em nome do progresso, compreendido sob um arsenal de valores que abrangem as estruturas ideológicas (LOVATTO, 2011).

Nesse sentido, ainda conforme Lovatto (2011), submetendo a problemática ambiental ao papel desempenhado pela Educação, convém ressaltar que a questão central da crise está vinculada à esfera ética, a qual do ponto de vista ecológico pode ser alterada a partir de uma mudança cultural

urgente que permitirá optar por outras formas de desenvolvimento. Do ponto de vista ecológico, o animal homem/mulher é tido como parte integrante do meio, e assim, todas as suas formas de interação com o ambiente passam a ter um papel importante nas modificações sofridas pelos sistemas naturais, à medida que os impactos antrópicos aumentam. Sustentabilidade ecológica diz respeito a um certo equilíbrio e manutenção de ecossistemas, à conservação de espécies e à manutenção de um estoque genético das espécies, que garanta a resiliência ante impactos externos (FOLADORI, 2002).

Igualmente são incorporadas na tridimensionalidade principal do desenvolvimento sustentável a sustentabilidade social e a sustentabilidade econômica (FOLADORI, 2002). A percepção de que a sustentabilidade depende de fatores diversos é promissora, porém as divergências teóricas ocorrem no meio acadêmico pela própria complexidade envolvida na concepção ampla do sentido desta ciência, que ultrapassa a tradicional dicotomia crescimento/desenvolvimento econômico e o tripé sócio-econômico-ambiental (SACHS, 2002). Assim, a sustentabilidade ecológica está relacionada com a integridade da natureza, no sentido de que quanto mais modificada pelo homem ela se torna, menor sustentabilidade ecológica é obtida. A crítica a esta teoria é a separação homem X natureza, sendo que o alcance da plenitude das relações com o ambiente dá-se a partir do reconhecimento das boas e equilibradas relações humanas com o meio e outros seres, e não a dissociação destes.

O conceito de sustentabilidade econômica é voltado ao crescimento econômico e eficiência produtiva. Os modelos de crescimento, produção de energia e renda que os países adotam é condizente com a sustentabilidade ambiental? Esse tipo de questionamento crítico deve ser constantemente adotado a fim da coesão entre todas as vertentes de pensamento. A sustentabilidade econômica é um dos principais desafios, pois tende a ser diretamente oposta à ecológica, especialmente devido ao modelo capitalista e de propriedade privada dos meios de produção e serviços, o qual preza, efetivamente, o lucro. Tendo em vista que o crescimento ilimitado é intrínseco desta dinâmica, Sachs (2004) aponta que o crescimento, mesmo que acelerado, não é sinônimo de desenvolvimento se ele não amplia o emprego, se não reduz a pobreza e se não atenua as desigualdades.

O conceito de sustentabilidade social é o que gera maiores dificuldades conceituais, e pode ser concentrado em duas principais temáticas: a pobreza e o incremento populacional. É notório que o aumento da população pressiona os recursos naturais e aumenta a produção de resíduos. Dessa forma, a crise ambiental tem estreita relação com fatores sociais, da ordem de organização social, modelos produtivos, distribuição de recursos, bens e serviços. Segundo Foladori (2002) tanto a pobreza quanto a degradação ambiental podem ter uma mesma causa que é a falta de

recursos ou de direitos de propriedade sobre esses recursos. A compreensão de que o incremento das capacidades humanas deve ser valorizado auxilia na promoção do aumento da qualidade de vida, que deve ser o objetivo e não a ponte ou o meio para uma natureza mais saudável, colocando o desenvolvimento humano em primeiro plano, há um melhor relacionamento com o ambiente externo (ANAND & SEN, 2000). Segundo Lovatto & Previdi (2008), verifica-se a inconsistência de qualquer ambição de sustentabilidade social e ambiental, considerando o caráter intrínseco desses aspectos, formulada em bases humanas racionalmente hierarquizadas, pois é contraditória a ideia de respeito ambiental quando não são cultivados valores mínimos de igualdade humana. Diversos aspectos sociais estão estreitamente relacionados com o ambiente natural, desde as relações de uso da terra e outros recursos naturais para produção de alimentos, como aspectos culturais e também históricos.

DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E SAÚDE COLETIVA

A Constituição Federal Brasileira de 1988 assegura no artigo 225 o princípio do meio ambiente ecologicamente equilibrado: *“Todos tem direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”*. Fica claro nessa leitura que é a coletividade que se beneficia com um ambiente equilibrado ao passo que também a todos cabe a responsabilidade na proteção dos bens naturais. Atentando que devemos usar os recursos naturais de forma moderada, apenas provendo as necessidades e com isso permitir que as próximas gerações continuem usufruindo com responsabilidade da natureza.

Apenas na segunda metade do século XX é que surgiu uma área da saúde chamada Saúde Ambiental. A Organização Mundial da Saúde define este ramo como ‘o campo de atuação da saúde pública que se ocupa das forma de vida, das substâncias e das condições em torno do ser humano, que podem exercer alguma influência sobre a sua saúde e o seu bem estar’ (BRASIL-MS, 1999).

A saúde ambiental naturalmente faz parte da saúde de todos os organismos vivos quando adotamos a ideia de que somos uma unidade, e que apenas em equilíbrio é que podemos manter relações promissoras. Efetivamente na saúde humana, ambientes degradados e poluídos podem ser responsáveis por espalhar doenças transmissíveis, bem como o saneamento é a forma mais efetiva na garantia de provisão de água e alimentos de boa qualidade (RIBEIRO, 2004), visto que a qualidade ambiental pode ter implicações diretas na saúde coletiva. Outras decorrências de um ambiente equilibrado e de qualidade na saúde estão relacionados -de forma prática- ao acesso a água potável e qualidade do ar, por exemplo, dentre outros. Saúde ambiental são todos aqueles

aspectos da saúde humana, incluindo qualidade de vida, que estão determinados por fatores físicos, químicos, biológicos, sociais e psicológicos no meio ambiente, que podem exercer alguma influência sobre saúde e o bem-estar. Também se refere a teoria e prática de valorar, corrigir, controlar e evitar aqueles fatores do meio ambiente que, potencialmente, possam prejudicar a saúde de gerações atuais e futuras (BRASIL, 2007; RIBEIRO, 2004).

A raiz social do problema ambiental é um dos principais pontos que deve ser estudado na construção e idealização de modelos de desenvolvimento mais condizentes com as situações contemporâneas enfrentadas e deve ser visto tanto como uma das causas do problema ambiental quanto os atores da solução, através da educação e inclusão participativa no gerenciamento e tomada de decisões. Há que se considerar que não há uma teoria do desenvolvimento sustentável e sim um conjunto de discussões e reflexões. Como observa Cavalcanti (1994) não há uma economia da sustentabilidade nem uma única forma de chegar aos predicados de uma vida sustentável. Para Sachs (2002), a sustentabilidade do desenvolvimento é um desafio planetário, que busca conciliar o interesse produtivo, principalmente, em termos de comércio internacional e o meio ambiente, com o objetivo de conciliar os interesses de políticas sociais e ambientais. Em termos de dinâmica produtiva, Sachs (2004) aponta para dois aspectos imprescindíveis para se atingir o desenvolvimento sustentável: a ênfase no mercado interno e a manutenção emprego decente e/ou o autoemprego para todos. Sendo que a distribuição das riquezas não deveria resultar da concorrência, mas sim da soma das ações individuais. As soluções devem emergir de discussões coletivas e constantes entre beneficiários, a sociedade civil organizada (terceiro setor), o Estado e o mercado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A crise ambiental deve ser enfrentada através de pequenas atitudes sustentáveis de cada um e por meio de uma pressão sobre os governos para a adoção de modelos de desenvolvimento baseados na promoção de uma melhor distribuição de renda e valorização das capacidades humanas, seguindo as diretrizes das agendas e dos acordos firmados mundialmente para a proteção da natureza. Havendo uma preocupação e interesse organizado por parte da sociedade é possível que sejam tomadas importantes medidas na adoção do uso de energias renováveis, recuperação de ambientes degradados e aplicação dos conhecimentos científicos para serviços de interesse coletivo, dentre outras.

Já dissera Fritjof Capra na educação ecológica, a natureza do todo em qualquer sistema vivo é sempre diferente da soma das partes. E é desse modo que a discussão ambiental deve ser estabelecida, valorizando a integralidade entre diferentes organismos e os ecossistemas e suas

relações ecológicas interligadas. Além disso, a conservação da biodiversidade não deve ser limitada apenas as espécies ameaçadas, pois a biodiversidade que envolve ecossistemas e paisagens também engloba a diversidade cultural e histórica dos povos.

A busca pelo equilíbrio nas relações com o ambiente deve ser considerada como prioridade no enfrentamento da crise ambiental contemporânea e a analogia com a manutenção da paz e a prevenção de conflitos é racional e lógica.

A QUESTÃO AMBIENTAL CONTEMPORÂNEA SOB A PERSPECTIVA DO MATERIALISMO HISTÓRICO*

RESUMO

Nesse trabalho pretende-se aprofundar a discussão sobre a questão ambiental utilizando o materialismo histórico como abordagem metodológica. A questão ambiental trata do estudo da degradação ambiental oriunda de um desequilíbrio nas relações homem-natureza, enquanto que a finalidade do materialismo histórico é o estudo da sociedade, da economia e da história onde as causas do desenvolvimento e mudanças na sociedade são procuradas nos meios pelos quais os seres humanos produzem coletivamente as suas condições concretas de vida no mundo material. À medida que a humanidade aumenta sua capacidade de intervir na natureza para satisfação de necessidades crescentes surgem tensões e conflitos quanto ao uso do espaço e dos recursos em função da tecnologia disponível. A análise das conexões sociedade-natureza por essa visão dialética valoriza o papel das relações econômicas na sociedade e, assim, possibilita uma compreensão mais clara dos atuais problemas ambientais. O desequilíbrio ambiental global é principalmente consequência das externalidades dos diversos processos produtivos e industriais, desde agricultura a manufaturados, especialmente no mundo globalizado onde a revolução tecnológica, nova dinâmica econômica e o aumento populacional tem sido fatores importantes nas tomadas de decisões e modificações no estilo de vida. A revolução industrial foi um momento decisivo na transição para a conformação da conjuntura histórica atual. A partir desse momento a combinação dos avanços industriais e seus reflexos diretos na nova dinâmica social fez com que a sociedade industrial formada a partir do século XIX determinasse um novo padrão de desenvolvimento demográfico. O impacto dessas mudanças, não foi apenas na produção e na economia, atingiu o mundo econômico, social e pessoal, sobretudo implicou em uma mudança no modo de vida, onde a vida rural, agrícola e artesanal, que até então era predominante, deu lugar a vida urbana e industrial. Em países de urbanização tardia, como o Brasil, esse processo não ocorreu somente por atração dos empregos gerados nas cidades, mas também pela expulsão do campo, onde instalaram-se as monoculturas dependentes de agrotóxicos, insumos e fertilizantes externos comercializadas a partir das ideias da Revolução Verde. A preocupação com o ambiente instigou a revolução ambiental, essa corrente emergiu após a Segunda Guerra Mundial e foi onde a humanidade percebeu que os recursos naturais são finitos e que seu uso incorreto pode representar o fim da sua própria existência. Assim a preocupação com as externalidades dos processos produtivos passaram a ser consideradas. Além disso os movimentos ambientalistas e os encontros mundiais para discutir os avanços e limites dos desenvolvimentos tem cada vez mais reforçado as ideias de conservação, preservação ambiental e sustentabilidade (econômica, social e ambiental).

Palavras chave: Revolução Ambiental; Externalidades; Sustentabilidade; Revolução Industrial; Conservação.

ABSTRACT

In this paper we intend to deepen the discussion about the environmental crisis using historical materialism as a methodological approach. The environmental issue deals with the study of environmental degradation arising from an imbalance in the relation between humankind and nature, while the purpose of historical materialism is the study of society, economy and history, considering the causes of development and changes in society in the means by which human beings collectively produce their conditions of life in the material world. As humanity increases its capacity to intervene in nature to meet growing needs, tensions and conflicts arise regarding the

*Nota do autor: Artigo em preparação para submissão.

use of space and resources in function of available technology. The analysis of the connections between society and nature by this dialectical vision values the role of economic relations in society and thus enables a clearer understanding of current environmental problems. The global environmental imbalance is mainly a consequence of the externalities of the various productive and industrial processes, from agriculture to manufactured goods, especially in the globalized world where technological revolution, new economic dynamics and population growth have been important factors in the decision making and modifications in the life style. The industrial revolution was a decisive moment in the transition to the conformation of the current historical conjuncture. From that moment on, the combination of industrial advances and their direct reflexes in the new social dynamics made the industrial society formed from the nineteenth century onwards to determine a new pattern of demographic development. The impact of these changes was not only on production and on the economy, but also social and personal. It mainly involved a change in the way of life, where rural, agricultural and artisanal life was predominant, to urban and industrial life. In late urbanized countries, such as Brazil, this process was not only caused by attracting jobs generated in the cities, but also by the expulsion of the countryside, where monocultures dependent on agrochemicals, inputs and external fertilizers were installed, raised from the idea of postwar green revolution. Concern for the environment instigated the environmental revolution, this current emerged after World War II and was where humanity realized that natural resources are finite and that their misuse could represent the end of their existence. Thus the concern with the externalities of the productive processes began to be considered. In addition environmental movements and global meetings to discuss progress and limits of development have increasingly reinforced ideas of conservation, environmental preservation and sustainability (economic, social and environmental).

Key-words: Environmental Revolution; Externalities; Sustainability; Industrial Revolution; Conservation.

INTRODUÇÃO

“A grande distância da vida do homem em relação às demais formas de vida não é biológica, mas sua história cultural, seu estado de consciência” (Ruy Moreira).

Para iniciar uma abordagem sincera e íntegra sobre a questão ambiental é preciso pensar que essa temática naturalmente é política, econômica e social, além de ambiental, como traz no nome. Não há como discutir esse tema sem visitar suas nuances multi e interdisciplinares. Além disso, sempre que se trata da preservação ambiental e da crise ambiental contemporânea, é retratada a Primeira Revolução Industrial como sendo o mais importante momento histórico, um marco onde o modo de produção, exploração de recursos e estilo de vida foram drasticamente alterados, com consequências evidentes na atualidade, que também serão comentadas. Assim, é tratado aqui qual contexto histórico e que conjunto de pensamentos levaram a Revolução Industrial para então entendermos as suas interfaces e seus desdobramentos na modernidade.

Nesse trabalho, pretende-se aprofundar a discussão sobre a questão ambiental utilizando o materialismo histórico¹ como abordagem metodológica, que, por sua vez, destina-se ao estudo da sociedade, da economia e da história efetivamente. Conforme as ideias de Marx, um dos principais

defensores dessa corrente, somos decorrência da *práxis*, da ação e dos conflitos históricos. Segundo Bernardes & Ferreira (2015), enxergar as relações sociedade-natureza pela visão dialética marxista, que valoriza o papel das relações econômicas, possibilita uma compreensão mais clara dos atuais problemas ambientais. Também serão discutidas as consequências geradas pelas externalidades do processo produtivo e industrial, desde agricultura a manufaturados, especialmente no cenário global atual onde a revolução tecnológica e o aumento populacional tem sido fatores importantes nas tomadas de decisões e modificações no estilo de vida.

CONTEXTO HISTÓRICO

Entre os séculos 1600 e 1700 a Europa, berço da cultura ocidental, se encontrava em um adiantado processo de expansão através da mercantilização, ampliação comercial ultramarina, colonialismo e ocupação do “novo mundo”, com a finalidade de buscar recursos naturais em outros lugares para suprir as demandas pungentes e, com isso, impondo a acumulação de capital como prática da elite e acelerando a formação do capitalismo num grupo de países do ocidente europeu. Esses países implementaram nas Américas um sistema em que caberia às colônias, estruturadas na grande propriedade, na monocultura e no trabalho compulsório, a transferência da sua produção às respectivas metrópoles, sendo o comércio e o mercantilismo elementos fundamentais norteadores da colonização (Erthal, 2000).

Concomitante a isso, o Brasil já passava pela fase colonial do capitalismo na América Portuguesa e os aspectos coloniais do Brasil se estenderam pelo período entre os séculos XVI e XIX. Desse modo, desenvolveu-se uma organização social subordinada aos interesses do capital mercantil mantida pelo aparato jurídico-administrativo-militar da metrópole. Tendo como prática a exploração dos recursos naturais de um território que já era habitado, porém ainda farto e conservado, em proveito do comércio europeu. A acumulação de capital e desenvolvimento do mercado interno ficou impossibilitado em função das relações impostas pelas metrópoles. Esse é o principal reflexo do capitalismo comercial, já presente no início da história brasileira e que ainda

¹ O materialismo histórico, pensamento desenvolvido por Karl Marx (1818-1883) e Friedrich Engels (1820-1895), fundamenta-se na análise da realidade a partir da teoria da infraestrutura e superestrutura que cercam um determinado modo de produção. Isto significa dizer que a história sempre está ligada ao mundo dos homens enquanto produtores de suas condições concretas de vida e, portanto, tem sua base enraizada do mundo material, organizado por todos aqueles que compõem a sociedade. Assim, o nosso jeito de ser e pensar é determinado pelas relações sociais de produção, isso significa o termo materialismo. Segundo Marx: “Não é a consciência dos homens que determina o seu ser, mas, ao contrário, é o seu ser social que determina a sua consciência.”

caracteriza o subdesenvolvimento do Brasil, e que, possivelmente, tenha sido a base para a construção ideológica do capitalismo industrial no final do século XVIII.

Em função das diversas transformações que vinham ocorrendo no mundo e da plasticidade da dinâmica social foi necessário fundar ideias para novas mudanças e um novo desenvolvimento. Desse modo, os séculos XVII e XVIII foram tempos de revoluções e profundas mudanças. No plano das ideias, o movimento iluminista exerceu e difundiu uma nova visão do homem e do mundo que, por sua vez, influenciou diretamente no plano econômico, político e social, onde as mudanças concretizaram-se por meio de revoluções, principalmente a Primeira Revolução Industrial (1760-1840), iniciada na Inglaterra, e a Revolução Francesa (1789-1799), marco histórico do início do período Contemporâneo.

O Iluminismo foi um movimento intelectual originado nas últimas décadas do século XVII e que se desenvolveu no século XVIII (o qual ficou conhecido como século das luzes em sua alusão), esse teve um papel fundamental ao propor novos valores baseados na ideia de que a humanidade caminharia no sentido do progresso e da liberdade, correspondendo a uma autêntica revolução na mentalidade. Abarcou inúmeras tendências e, entre elas, buscava um conhecimento apurado da natureza, com o objetivo de torná-la útil ao homem moderno e progressista. Esse movimento não foi homogêneo e não formou escola filosófica ou sistema de ideias plenamente organizado. Mas as influências desse pensamento permearam diretamente uma das maiores mudanças globais, a Primeira Revolução Industrial.

REVOLUÇÃO INDUSTRIAL

A revolução industrial foi o grande processo de mecanização da indústria que teve início no final do século XVIII. Ainda que existissem alguns tipos de máquinas antes desse período, como as de guerra, moinhos de vento, moendas ou teares manuais, foi no final desse século e início do XIX que isso se estabeleceu com força na sociedade em geral e que revolucionou a vida das pessoas e das comunidades. Essa revolução consistiu primordialmente no desenvolvimento de novas técnicas de produção de mercadorias, com uma nova tecnologia, e em uma nova forma de divisão social do trabalho. Durante esse processo houve uma preocupação do homem em criar aparelhos e o uso das máquinas passou a ser um dos elementos do cotidiano. O impacto dessas mudanças, não foi apenas na produção e na economia, atingiu o mundo social e pessoal, sobretudo implicou em uma mudança no modo de vida, onde a vida rural, agrícola e artesanal, que até então era predominante, deu lugar a vida urbana e industrial.

A revolução industrial foi possível porque houve um movimento histórico estruturado no mundo ocidental que criou condições para o seu desenvolvimento, baseados principalmente nas

ideias iluministas, conforme supracitado. Além disso, diversos fatos pela Europa influenciaram a industrialização, como a propriedade privada dos meios de produção (onde o trabalho deixou de ser servil para ser assalariado, apesar das condições de subemprego), a exploração da mais-valia e a divisão e segmentação do trabalho.

A combinação dos avanços industriais e seus reflexos diretos na nova dinâmica social fez com que a sociedade industrial formada a partir do século XIX determinasse um novo padrão de desenvolvimento demográfico. Diferentemente das sociedades rurais, que eram pré-industriais e mantinham altas taxas de mortalidade e natalidade, mantendo curta a expectativa de vida, nos centros urbanos e industriais manteve-se a taxa de natalidade mas a mortalidade decaiu, o que aumentou a expectativa de vida, em um ritmo que a população cresceu significativamente (Tabela 1). Entre o final do século XVIII e início do XIX a população mundial aumentou de 900 milhões para 1,5 bilhão de habitantes. E no século XX essa tendência de crescimento elevou-se consideravelmente. Especialmente na Inglaterra, entre 1700 e 1750, a população permaneceu relativamente estável, com baixo crescimento, então, entre 1750 e 1850, ela mais que dobrou (Wilde, 2017).

Concomitantemente com essas mudanças de conjuntura social, Thomas Robert Malthus (1766-1834), um influente intelectual iluminista britânico da época, percebeu o iminente crescimento populacional em razão das melhores condições sanitárias, do combate às doenças e do aumento da produção de alimentos, todos benefícios decorrentes da revolução industrial.

Tabela 1: Histórico do crescimento populacional humano até o presente ano e projeções do crescimento populacional, segundo a Organização das Nações Unidas.

Período	Intervalo de tempo (anos)	Número de pessoas (bilhões)
1850- 1925	75	1- 2
1925- 1962	37	2- 3
1962- 1975	13	3- 4
1975- 1985	10	4- 5
1985- 1994	9	5- 6
1994- 2017	23	6- 7,5
2017- 2030	13	7,5- 8,5
2030- 2050	20	8,5- 9,8
2050- 2100	50	9,8- 11,2

Fonte: ONU Perspectivas do crescimento populacional 2017, com modificações.

Preocupado com o aumento acelerado da população, Malthus publicou, anonimamente, em 1798, o Ensaio sobre o Princípio da População (*An Essay on the Principle of Population*), obra em que expôs suas ideias e preocupações acerca da população do planeta. O foco principal da obra era o alerta que a população crescia em progressão geométrica, enquanto que a produção de alimentos crescia em progressão aritmética. No limite, isso acarretaria uma drástica escassez de alimentos e, como consequência, a fome. Portanto, inevitavelmente o crescimento populacional deveria ser controlado.

Assim como qualquer praga biológica em um sistema natural, ela ocorre quando a população de uma dada espécie tem alta taxa de natalidade e baixa taxa de mortalidade, de modo que o número de indivíduos cresce, pressionando os recursos naturais a ponto de desequilibrar o meio ambiente. Foi o que esteve prestes a acontecer com a pressão exercida pela espécie humana e que foi retardado pelo progresso técnico incorporado a produção agrícola, com a Revolução Agrícola, que embora aparentemente positiva, por possibilitar o aumento da produção no campo, tem seus efeitos presentes nas causas de desequilíbrios ligados a crise ambiental.

Até meados do século XIX o processo de industrialização esteve restrito basicamente a Inglaterra, porém os avanços foram tão intensos que rapidamente os recursos utilizados pelas primeiras indústrias já estavam se esvaindo. Então, as extensões da industrialização Britânica expandiram-se para os países da Europa Ocidental, EUA e Ásia no século XIX, alcançando toda a superfície do planeta no século XX. A consequência direta dessa expansão foi o processo intensificado do colonialismo e novos ciclos demográficos, pois o crescimento populacional implicou na grande movimentação de populações em diversas direções, do campo para a cidade, das pequenas para as grandes cidades, de regiões mais pobres e rurais para as mais industrializadas, e finalmente deslocamentos transoceânicos, sobretudo para o continente americano. Na passagem do XIX para o XX o contingente das grandes cidades triplicou e a população urbana se aproximou dos 20%, apesar do incessante ritmo de crescimento das cidades, até o início do século XX a maioria da população vivia no meio rural.

Do século XIX até a explosão da Primeira Guerra Mundial (1914), o período foi marcado por profundas mudanças históricas. As potências industriais iniciaram ciclos de expansão do capitalismo, também conhecido como Imperialismo, dividindo entre si boa parte do planeta (Neocolonialismo), onde novos mercados consumidores e de fornecimento de matérias-primas e mão de obra (escrava) foram explorados. Tal expansão deve-se a estrutura capitalista impulsionada pelos progressos técnicos cujos conjuntos muitos denominam Segunda Revolução Industrial, ou mais adequadamente Revolução Científico-Tecnológica. As mudanças ocorridas a partir de 1870, não correspondiam simplesmente a prolongamentos da Primeira Revolução Industrial. Nessa

época, o trinômio formado por ferro, carvão e máquinas a vapor não conseguia mais suportar o nível de produção das mercadorias e muito menos aumentar a produção, então iniciaram-se uma série de transformações diferentes daquelas do fim do século XVIII, ocasionando um novo surto industrial com as descobertas do petróleo e outros produtos na área química, bem como a eletricidade e o aço.

No início do século XX o modelo capitalista já estava estabelecido na sociedade contemporânea. A nova base científica-tecnológica impulsionou inovações em diversos setores, não se restringindo a produção de mercadoria e industrialização, serviços públicos também melhoraram nas grandes cidades, acarretando mudança da vida nos centros urbanos através do desenvolvimento do transporte coletivo, locomotivas elétricas, motores a gasolina, pneus de borracha, automóveis, além dos sistemas de comunicação e da medicina que passaram a ser mais desenvolvidos. A nova escalada de produção, de novidade e quantidade de mercadorias implicou no desdobramento de uma necessidade permanente de ampliação de novos mercados consumidores e a busca incessante de matéria prima, impondo uma nova divisão econômica internacional entre os países industriais produtores de bens de consumo e os países consumidores de bens industriais e fornecedores de matéria prima. Essa divisão determinou a partilha do mundo como ainda entendemos hoje.

O desenvolvimento geográfico desigual dos países demonstra a divisão internacional do trabalho, os quais reproduzem variações significativas em nível regional. Portanto, a mais-valia e o valor gerado em determinado lugar não se realizam plenamente onde se produzem, mas se distribuem em função das estratégias econômicas, financeiras e políticas, contribuindo para a acumulação em um ponto e transferindo o valor das áreas de baixa produtividade para as de produtividade mais elevada. Tais mecanismos e trajetórias tornam-se cada vez mais complexos, onde as inovações tecnológicas possibilitam a transferência de valor de forma mais ampla (Bernardes & Ferreira, 2015).

Esse movimento foi definido como a globalização da economia ou globalização do capitalismo. Visto que alguns países já mais desenvolvidos e com as devidas tecnologias passaram a explorar a mão de obra em lugares onde essa era abundante e barata e extrair recursos naturais em países com histórico colonial e subdesenvolvidos. As primeiras multinacionais começaram a atuar na forma de manter as funções administrativas e de controle como o centro dos negócios e subcontratar funções que não eram tão estratégicas para a companhia. Assim, a subcontratação e a transferência do sistema de produção para outros locais- *offshoring*², resulta na fragmentação da produção (Fleury, 2017).

No século XX, o complexo econômico-científico limitou-se a objetificar e consumir a matéria existente na natureza. O caráter destrutivo não era mais que um efeito secundário, considerado indireto. Ao contrário do período após a Segunda Guerra Mundial, onde o sistema passou não apenas a intervir na natureza, mas a produzir uma “outra natureza”. Não reconhecendo nenhuma outra lógica que não a própria, e portanto nenhum limite natural, o complexo econômico-científico é insensato o bastante para querer se emancipar plenamente da natureza. A possibilidade de escassez de energia fóssil ameaçava o desenfreado avanço pelo encontro dos limites naturais, então a resposta foi a tecnologia atômica (Kurz, 2001).

Ainda nessa época, os importantes conflitos mundiais, representados pelas guerras, mudaram muito o cenário da indústria. É necessário mencionar a indústria bélica como uma grande responsável na geração de impactos diretos e indiretos sobre o bem estar humano e dinâmica econômica e social. Isso se dá pela perda da vida das pessoas, integridade e dignidade, além da destruição material e cultural. Assim, a ciência, a economia e o aparato estatal remontam a uma raiz comum, a revolução militar e das armas de guerra da era moderna. Daí também o viés especificamente masculino e patriarcal da modernidade. A revolução social ocasionada pelos combates rompeu as estruturas da economia agrária com a formação de exércitos regulares, com a ampliação da indústria mineradora e de uma emergente indústria armamentista até ali desconhecida (Kurz, 2001).

A técnica nuclear foi avançando paralelamente tendo como justificativa a produção de energia como uma alternativa para a base energética decadente. Porém a descoberta da fissão nuclear, em 1938, na véspera da Segunda Guerra Mundial, por uma equipe de pesquisadores alemães no Instituto Kaiser Wilhelm em Berlim, possibilitou o desenvolvimento da bomba nuclear durante a referida guerra. Entre 1939 e 1945, a maioria do desenvolvimento foi focado na bomba atômica, enquanto que, ao longo dos anos 60 e 70, vários programas nucleares foram iniciados em diferentes países.

Mais tarde, conscientes do perigo de armas nucleares os governos começaram a estabelecer tratados para regular seu uso, sem deixar de promover o uso dessa energia no campo civil. É neste momento que as primeiras usinas nucleares para a geração de eletricidade começam a aparecer. Em 1972, entra em vigor o tratado de não-proliferação nuclear, onde os signatários concordaram

² *Offshoring*: se dá quando uma empresa transfere uma das suas instalações industriais de uma determinada localidade para outra, onde produzirá exatamente o mesmo produto, da mesma maneira, só que com mão-de-obra mais barata, uma carga tributária menor, energia subsidiada e menores gastos com os planos de saúde dos funcionários (Blinder, 2006).

em não transferir armas nucleares ou trabalhar para a sua fabricação, e comprometeram-se a estabelecer as salvaguardas necessárias para o seu cumprimento (WNA, 2014). Apesar disso, vivemos ainda hoje ameaças de guerras nucleares, especialmente vindas do conflito simbólico entre Estados Unidos, Coreia do Norte e Irã, cujos prenúncios sobre o uso de armas nucleares estão sendo noticiadas abertamente.

Os riscos da energia nuclear são elevadíssimos, sendo que não existe um nível seguro de radiação, mesmo em quantidades ínfimas ela pode produzir mutações e doenças. Um outro problema sério são os resíduos atômicos. O plutônio, por exemplo, é o elemento mais letal de todos os produtos do lixo atômico, menos de um milionésimo de grama já é cancerígeno e cerca de 500 gramas, se uniformemente distribuídos, poderiam induzir potencialmente o câncer pulmonar em todas as pessoas do planeta. Sendo que cada reator comercial produz de 200 a 250 quilos de plutônio por ano. (Capra, 1982). Os perigos de desastre ambiental ficaram evidentes quando, em abril de 1986, ocorreu o maior acidente nuclear da história, na região de Chernobil antiga União Soviética, espalhando radiação por cerca de 3.000 km. Além disso, intencionalmente em agosto de 1945, os Estados Unidos usaram o poder destrutivo dessa arma contra alvos civis do Japão, sendo a primeira e única vez que esse artifício foi usado em guerra. Só em Hiroshima morreram 140 mil pessoas devido à bomba e em Nagasaki, o número de vítimas fatais foi de cerca de 135 mil, sendo que até hoje são reconhecidas outras vítimas da destruição nuclear nas cidades. Esses catastróficos eventos históricos trouxeram a tona a necessária discussão sobre as externalidades decorrentes da Revolução Científica-Tecnológica-Industrial.

Sobre externalidades, Ludovic Aubin (2017) as define da seguinte maneira:

“As externalidades são os efeitos colaterais da produção de bens ou serviços sobre outras pessoas que não estão diretamente envolvidas com a atividade. Em outras palavras, as externalidades referem-se ao impacto de uma decisão sobre aqueles que não participaram dessa decisão. Essa definição pode ser ampliada dizendo que se trata dos efeitos da produção de um bem ou serviço sobre terceiros (humanos ou não humanos), cujos custos financeiro, sanitário ou simbólico são assumidos por esses terceiros, e não pelos tomadores de decisão nem pelos emissores.”

Existe uma tendência de que os processos econômicos, industriais e sociais gerem externalidades com implicações profundas, onde cada um dos agentes contemporâneos podem ser, ao mesmo tempo, “autor” e “vítima” das externalidades. Segundo Aubin (2017), não há mais como externalizar os riscos, a poluição ou, ainda, a violência sem que cada um seja afetado por aquilo que rejeitou ou expulsou sob várias formas (física, biológica ou simbólica) e em vários graus de

responsabilidades. Portanto, as externalidades devem ser consideradas um dos principais fatores que levam ao colapso ecológico-social. O modo social de agir da sociedade tende a considerar apenas a produção, mercado, poder e o dito “progresso”, não levando em conta os aspectos ecológicos e humanos interligados e resultantes dessas complexas ações. Os processos de produção são basicamente lineares e não sistemas fechados, alcançando assim incessantemente os limites críticos dos recursos e desencadeando a crise ambiental. Desse modo, é necessária a ênfase no caráter interdependente e globalizado dos múltiplos fatores que afetam a sociedade moderna e globalizada: poluição generalizada, perda intensiva de diversidade biológica e cultural, mudanças climáticas, explosão demográfica, persistência das tradicionais assimetrias Norte-Sul e intensificação dos conflitos interétnicos e dos assustadores índices de exclusão social, miséria e criminalidade (Vieira, 2009).

As externalidades representam o preço das tentativas de manter e de aumentar o crescimento, e de contrariar a teoria populacional Malthusiana sobre os limites do crescimento. Segundo Boff (2015), elas são fundamentalmente duas: uma degradante *injustiça social* com níveis altos de desemprego e crescente desigualdade; e uma ameaçadora *injustiça ecológica* com a degradação de ecossistema inteiros, erosão da biodiversidade, escassez de água potável e insustentabilidade geral do sistema-vida e do sistema-Terra.

A ideologia de progresso vigente era, até então, um avanço a qualquer custo em detrimento das outras nações subordinadas, da natureza e do bem estar humano. Um dos impactos mais evidentes do modelo de desenvolvimento em curso no pós-guerra foi a devastação da natureza e a poluição generalizada, que atingiram os continentes e as formações econômicas e sociais, indistintamente (Moraes, 2003). Nas bases capitalistas, esse sempre foi antagônico ao desenvolvimento, pois não é possível haver real desenvolvimento enquanto houver qualquer exploração e desigualdades. O progresso é uma ideia e uma aspiração do século XVIII, enquanto o desenvolvimento é um conceito e um projeto do século XX, do pós-Segunda Guerra Mundial (Bresser-Pereira, 2014). Nessa época, as organizações ambientalistas se multiplicaram e trouxeram o debate à pauta política onde, no início dos anos 1970, eclode a revolução ambiental³.

³A revolução ambiental passou a influenciar decisivamente a reflexão sobre o fenômeno do desenvolvimento. De um ponto de vista inovador, começou a ser questionada a legitimidade de uma concepção que coloca a ideologia economicista no comando dos processos de modernização. Essa tomada de consciência inspirou também uma percepção mais nítida dos impactos ecológicos e sociais gerados pela “tecnociência sem consciência”. Por outro lado, apesar do peso assumido pelas controvérsias de natureza conceitual-teórica e ético-política, intensificou-se a pesquisa sobre os condicionantes estruturais da crise socioecológica (Vieira, 2009).

O AVANÇO INDUSTRIAL NO PÓS-GUERRA

Esse período em questão, é marcando por um avanço tecnológico industrial notável, onde novas técnicas despontam a cada dia e novos compostos químicos são continuamente sintetizados e comercializados pelas multinacionais. Dessa forma, pode-se dizer que a revolução industrial é um marco histórico intermitente e ascendente, com diversas fases que intrinsecamente levam às etapas subsequentes.

As mudanças recentes tem sido drásticas e inéditas na história, sendo que em dez anos, a hierarquia entre os países na produção mundial da indústria de transformação mudou consideravelmente. Em 2016, a liderança industrial coube à China, seguida por EUA, Japão e Alemanha. A Índia se tornou a quinta maior produtora, ultrapassando Coreia do Sul, Itália, França, Reino Unido e Brasil. A Ásia-Pacífico deverá crescer na Taxa de Crescimento Anual Composta (*Compound Annual Growth Rate-CAGR*), sendo que representou mais de 30% da receita global em 2016. Espera-se que economias emergentes, como a Coreia do Sul, Índia, China e Indonésia, passem por um forte crescimento econômico nos próximos anos. O aumento da população e do padrão de vida deverá aumentar ainda mais a compra de produtos eletrônicos, cosméticos e soluções médicas tecnologicamente avançadas na região (IEDI, 2017).

Frente a realidade do desenvolvimento industrial brasileiro é importante falarmos sobre a natureza das multinacionais. Essas, desde a década de 1950, através das suas subsidiárias, são parte importante da economia nacional. Na verdade, elas foram convidadas a se instalar no Brasil para liderar o processo de desenvolvimento da indústria brasileira, especialmente naqueles setores que são mais intensivos em tecnologia (Fleury, 2017). A chegada das multinacionais e essa onda de industrialização brasileira surge juntamente com a revolução verde, denotando a clara ligação da indústria química com o agronegócio, contrariamente as ideias críticas da revolução ambiental que surgia.

A indústria brasileira esteve sempre refém da política mundial e nunca efetivamente desenvolveu a estabilidade e autonomia que seriam inerentes aos negócios (reforçando a ideia de que a influência do Brasil colonial ainda interfere na política brasileira atual), como pode ser visto pela magnitude das crises que a indústria brasileira sofreu, as quais criaram desafios importantes para as profundas transformações tecnológicas que começam a redefinir o processo de produção industrial no mundo (IEDI, 2017). O último período de recessão da indústria nacional, que talvez tenha sido a mais forte da economia e da indústria brasileira desde o ápice do processo de industrialização no Brasil (onde o índice de uso da capacidade industrial girou em torno de 76% enquanto o emprego 19,5% abaixo), é um fator de grande preocupação, porque a indústria do futuro não vai dar tempo para a indústria brasileira se restabelecer. Nossos concorrentes já são

ativamente envolvidos em novas políticas de promoção do desenvolvimento industrial e da inovação (Coutinho, 2017). Tal indústria do futuro, ou também chamada de indústria 4.0, que o Brasil pode não acompanhar inicialmente devido a estagnação, é marcada por manufatura avançada, possibilidade de integrar todo o sistema produtivo, não mais necessariamente por redes corporativas mas via internet, fundindo-se o mundo físico ao mundo virtual.

Estamos em um momento de rupturas de grandes ciclos tecnológicos, aquilo com que estamos acostumados, como o conceito de trajetória, se dissolve. Houve, nos últimos anos, um avanço muito grande da combinação da capacidade de supercomputação (*big data*) com instrumentação científica altamente poderosa, e disso resulta, por exemplo, um avanço na ciência da matéria e das nanotecnologias, especialmente discutidas nesse trabalho.

O avanço na indústria química pode ser verificado pelo absurdo aumento na síntese de novas substâncias orgânicas e inorgânicas registradas no CHEMCATS[®]. Essa plataforma conhecida como *Chemical Abstract Service* (CAS), que é uma divisão da Sociedade Americana de Química (*American Chemical Society*), tem registrada atualmente mais de 133 milhões de compostos químicos. Sendo que no seu histórico do número de substâncias catalogadas, em 2007 haviam aproximadamente 14 milhões de produtos, enquanto que em 2010 já haviam 44 milhões de itens (CAS, 2017; Schenck, 2011). Tal aumento reflete o trabalho das novas tecnologias de inovação industrial e domínio sobre as matérias primas em um mundo condicionado a dependência tecnológica. Evidentemente que todos esses compostos estão disponíveis e tem sido utilizados nos bens de consumo e serviços distribuídos e comercializados ao redor do mundo. Porém, para grande parte desses compostos apenas sua aplicação e potenciais utilidades são conhecidas, enquanto que as informações toxicológicas, sobre regulamentação de uso e descarte no ambiente são escassos.

Se considerarmos apenas o ramo da nanociência e nanotecnologia, cujo mercado e pesquisas despontaram no século XXI e que tem sido um dos movimentos mais difundidos e promissores da atualidade, apesar do desconhecimento e ignorância do senso comum acerca da matéria, o mercado global apenas de nanopartículas oxido-metálicas (NOM) foi estimado em 4,2 bilhões de dólares em 2016. Prevê-se que o avanço científico e a extensa pesquisa realizada no setor biomédico impulsionem a demanda, além do aumento no consumo de produtos de cuidado pessoal também impactar de forma positiva. As NOMs representam um vasto campo a ser explorado na química de materiais que atrai um interesse considerável devido às suas potenciais aplicações tecnológicas. Espera-se que o emprego desses materiais traga um avanço significativo na área de medicina, informação e tecnologia, catálise, armazenamento de energia e dispositivos eletrônicos. Os produtos fabricados com nanopartículas (NP) estão fazendo progressos

significativos em termos de comercialização e avanços na pesquisa e desenvolvimento (Grand View Research, 2017).

O dióxido de silício (SiO_2) ocupou a maior participação no mercado de nanomateriais em 2015, o uso extensivo de SiO_2 se dá na fabricação de tintas, plásticos, baterias, cosméticos, vidro e borracha, além de aplicações biomédicas como transportadora de medicamentos e como parte integrante de dispositivos eletrônicos. As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2), são depois do SiO_2 , as nanopartículas manufaturadas (*Engineered Nanoparticles*) mais produzidas e usadas, com uma produção anual nos USA de 10.000 toneladas por ano e aplicação em eletrônica, óptica, cuidados médicos e pessoais, tintas, revestimentos e energia (Sun, 2014; Piccinno *et al.*, 2012; Vance, 2015). As perspectivas apontam que essas continuarão sendo nos próximos anos as NOMs mais utilizadas e consumidas.

Estudos apontam que a crescente demanda por nanotecnologia no tratamento de câncer e distúrbios do sistema nervoso central deverá incrementar a demanda por nanopartículas de TiO_2 na aplicação médica. Além disso, o crescente mercado de eletrônicos na China, Japão, Coreia do Sul e Singapura deverá aumentar o uso de nano- TiO_2 no processo de fotocatalise de semicondutores. O aumento do financiamento e do investimento do setor de nanotecnologia por países como China, Rússia e Reino Unido também deverá facilitar o desenvolvimento nanotecnológico. Além disso, há uma crescente migração de instalações de fabricação da Europa e América do Norte para partes da Ásia, devido ao baixo custo trabalhista e políticas governamentais favoráveis na região (*offshoring*) (GVR, 2017). Então, espera-se que essa tendência tenha um forte impacto nos padrões de consumo regional, enquanto as possíveis externalidades desse processo produtivo seguem profundamente negligenciadas, especialmente os riscos para a saúde associados à exposição humana, como distúrbios do sistema respiratório e indução do mau funcionamento do trato gastrointestinal.

Agências regulatórias internacionais como *Food and Drugs Administration, U.S. Environmental Protection Agency* e *Health and Consumer Protection Directorate* estão investigando de forma incipiente os impactos potencialmente prejudiciais das NPs no meio ambiente e na saúde humana. No entanto, a maior parte dos estudos tem sido feito pelas universidades e institutos de pesquisa, em geral através de financiamento público. É evidente que não é de interesse da iniciativa privada, que articula juntamente com as indústrias, que seja investigado a poluição decorrente dos resíduos industriais e seus efeitos sobre a saúde e bem estar das pessoas e de todos os seres vivos inevitavelmente expostos. No Brasil, a portaria nº 1.358 de 20 de agosto de 2014, instituiu o Comitê Interno de Nanotecnologia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA e designou algumas providências como acompanhar a evolução

das políticas regulatórias em âmbito internacional com relação à nanotecnologia de interesse da saúde e da vigilância sanitária e acompanhamento da tramitação na câmara da Política Nacional de Nanotecnologia. Esta última, trata-se do projeto de lei nº 6.741/2013 proposto pelo Deputado Sarney Filho (PV-MA), que dispõe sobre a pesquisa, produção, destino de rejeitos e o uso da nanotecnologia no país. Além disso, há outro projeto de lei proposto pelo mesmo parlamentar, PL 5133/2013, o qual determina que todos os produtos desenvolvidos com nanotecnologia contenham rótulos com a informação. No entanto, até o momento, nenhuma política oficial de regulamentação foi estabelecida no Brasil.

Os estudos científicos acerca do tema e publicados nos meios acadêmicos estão em avanço exponencial. Para simular o aumento das publicações, utilizando a plataforma de pesquisa *ScienceDirect*, foi feita a busca pelos termos: *nanoparticle*, *nanoscience* e *nanotechnology* (nanopartícula, nanociência e nanotecnologia). Entre os anos 1990 a 2000 foram encontrados 12 resultados; entre 2000 e 2010: 1.730 e de 2010 até o dia 03/11/2017 haviam 5.417 resultados. Fica mais que evidente que esse é o século da nanociência avançando sobre a indústria e tecnologia. Acontece que até então, apesar do aparente aumento da preocupação, o interesse no aprofundamento nos estudos sobre a segurança dessas tecnologias está restrito as pesquisas acadêmicas e alguns poucos atores políticos e da sociedade civil organizada. Enquanto que o senso comum da população é formando em torno do discurso de nanotecnologia como essencialmente moderna e positiva, reforçado pelas estratégias midiáticas do mercado. É necessário a construção coletiva de uma nova consciência e retórica, parafraseando Jean Restand, “a obrigação de suportar, nos dá o direito de saber”.

O AVANÇO DO AGRONEGÓCIO

Nessa mesma perspectiva da segunda metade do século XX, também o modelo de agricultura foi drasticamente alterado com consequências marcadas pela degradação social e ambiental. As práticas e técnicas de produção agrícola instituídas tiveram a finalidade de expandir a produção, praticada com base na monocultura, uso de máquinas e implementos para o preparo do solo, corretivos de solo, variedades adaptadas ou geneticamente modificadas para produção em todas as ocasiões e condições possíveis e o uso de agrotóxicos destinados ao controle de pragas e doenças em plantas. No entanto, a má aplicação desses artifícios é responsável por grande parte da perda do solo nos processos erosivos e da contaminação da terra e recursos hídricos. Já a degradação social vem principalmente da expulsão das famílias do campo que foi sempre acompanhada pela miséria de milhões de retirantes e camponeses, além de uma aceleração da criminalidade e superpopulação nas periferias das grandes cidades. Em 1950, a população rural

brasileira correspondia a 63,84% da população total. Como consequência do processo de industrialização e modernização da agricultura, a população brasileira deixou de ser predominantemente rural no período 1960-1970, sendo que entre 1950 e 2000, a população urbana aumentou 633,4% (Girardi, 2017). Segundo o IBGE (2017), atualmente a população nas cidades do Brasil passa de 84,4%, enquanto que 60,4% dos municípios são rurais e concentram apenas 16% da população.

No processo de desnaturalização da agricultura e industrialização da vida no campo, os mesmos compostos químicos excedentes da guerra passaram a ser utilizadas para o controle de pragas da agricultura. Como foi o caso do agente laranja usado na guerra do Vietnã. Esse composto é formado a partir da mistura de dois herbicidas, o 2,4-D e o 2,4,5-T, que foram usados entre 1961 a 1971, como desfolhante pelo exército dos Estados Unidos sobre o Vietnã. Os cerca de 80 milhões de litros despejados desse composto venenoso em combate ainda hoje fazem parte do legado fatídico na realidade das pessoas, na forma de taxas elevadas de câncer, distúrbios digestivos, respiratórios e epidérmicos, abortos espontâneos e crianças com defeitos congênitos. Acredita-se que a dioxina⁴ seja o subproduto mais tóxico do agente laranja, e essa, por sua vez, é a molécula mais tóxica produzida pelo homem.

O 2,4,5-T já foi banido há décadas, enquanto o 2,4-D continua até hoje no mercado. Esse último foi o primeiro herbicida orgânico sintetizado pela indústria química, em 1941. Processos de reavaliação toxicológica aconteceram nos EUA, Canadá, Nova Zelândia e na Comunidade Europeia, assim como no Brasil e, em todos, os resultados levaram à manutenção do 2,4-D nos respectivos mercados. Porém pesquisas com modelos de estudo animal relataram que 2,4-D induziu formação de micronúcleos e quebras no DNA, que indicam mutagenicidade e genotoxicidade do contaminante, ou seja, danos sérios a integridade dos cromossomos e DNA, que podem levar a mutações ou morte celular (Arcaute *et al.*, 2016).

No período pós-guerra os compostos químicos em produção acelerada tornaram-se os venenos nos pacotes tecnológicos vendidos ao agronegócio. Esse sustentou o uso na alegação da necessidade de aumentar a produção de comida, ocultando a principal manobra que fora garantir a rentabilidade para o modelo do oligopólio agrícola capitalista e garantir que empresas de

⁴Dioxina: A 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (C₁₂H₄Cl₄O₂), também conhecida como TCDD é um subproduto da fabricação do agente desfolhante (não exclusivamente), altamente tóxica e teratogênica, seu grau de periculosidade ultrapassa até o urânio e o plutônio. Esta substância surge quando moléculas de cloro são submetidas a altas temperaturas, em presença de matéria orgânica, nestas condições algum tipo de dioxina é gerada, visto que a dioxina é membro de uma numerosa família que atinge 200 membros igualmente perigosos.

produtos químicos que abasteciam a indústria bélica norte-americana transferissem seus serviços para herbicidas, fungicidas, inseticidas e fertilizantes químicos.

Esse marcante movimento foi denominado como “Revolução Verde”. Iniciada na década de 1960, teve como objetivo consciente, desde o início, comercializar variedades que pudessem ser cultivadas num amplo leque de condições em todo o mundo em desenvolvimento. A proposta das grandes companhias era reunir num pacote –daí a conotação de pacote tecnológico- os insumos básicos que um fazendeiro precisaria, desde a semente de uma variedade melhorada e possivelmente geneticamente modificada, os fertilizantes solúveis capazes de nutrir as culturas através da fertilização sintética, o inseticida que elimina as pragas até os herbicidas que, em amplo espectro, destruiriam todas as plantas sem interesse comercial e consideradas daninhas, restando apenas a cultura de interesse que por sua vez é resistente, assim como é o caso da soja transgênica resistente ao glifosato, por exemplo (Matos, 2010). Esse artifício baseou-se na ideia implícita de que toda técnica destinada a solucionar o desafio alimentar no mundo é moralmente justificável e, portanto, deve ser aplicada. As reações ambientalistas centralizam-se na crítica à produção industrial, que no espaço rural, adquiriu a forma dos pacotes e, no Brasil, assumiu –marcadamente nos anos 60 e 70– a prioridade do subsídio de créditos agrícolas para estimular a grande produção agrícola, as esferas agroindustriais, as empresas de maquinários e de insumos industriais para uso agrícola –como tratores, herbicidas e fertilizantes químicos–, a produção de processados e a agricultura de exportação (Moreira, 2000).

Em contrapartida a esse projeto político-ideológico transplantado da indústria bélica para a agricultura, a contracorrente desse modelo leva em conta a poluição e envenenamento humano, dos recursos naturais e dos alimentos, a perda da biodiversidade, a destruição dos solos e o assoreamento de nossos rios, e advoga um novo requisito à noção de desenvolvimento: o de prudência ambiental. Desta crítica, que contempla o modelo concentrador e excludente da modernização tecnológica brasileira socialmente injusta, emergem tanto os movimentos de agricultura alternativa como os de conservação ambiental (Moreira, 2000; Matos, 2010). Outro componente da análise à Revolução Verde é de natureza econômica onde, conforme Moreira (2000), a elevação dos custos associada às crises do petróleo dos anos 70 resultou em um processo de elevação de custos do pacote tecnológico, prejudicando majoritariamente os pequenos produtores e agravando os problemas sociais já mencionados.

Desse modo, segundo Aubin (2017) a agricultura convencional se tornou o exemplo da situação de contraprodutividade global por ter gerado um paradoxo fundamental: ela deveria ser uma atividade voltada à produção de alimento, ou seja, à manutenção da vida, porém ela é um dos principais agentes de poluição, de esgotamento dos recursos naturais e de escândalos na esfera da

saúde pública. Isso porque, visando o aumento de produção e lucros, é ignorado o princípio da precaução, que é um enunciado moral e político onde a ausência de certeza, levando-se em conta os conhecimentos científicos disponíveis, é encarada como razão suficiente para impedir o desenvolvimento e/ou o emprego de tecnologias que podem gerar danos graves ou irreversíveis para a saúde e para o meio ambiente. A aplicação desse princípio implica que o ônus da prova deve ser invertido, passando a ser assumido pelos interessados na introdução das novidades tecnológicas potencialmente nocivas (ABRASCO, 2015).

Em decorrência desse modelo químico-dependente de agrotóxicos, a cadeia produtiva do agronegócio se configura como um processo de insustentabilidade ambiental, pois no seu espaço se cria um território com muitas situações de vulnerabilidades ocupacionais, sanitárias, ambientais e sociais. Tais vulnerabilidades induzem eventos nocivos que se externalizam em trabalho degradante e análogo ao escravo, acidentes de trabalho, intoxicações humanas, cânceres, má-formações, mutilações, sequelas e ainda contaminação com agrotóxicos e fertilizantes químicos das águas, do ar, da chuva e do solo em todos os espaços ou setores da cadeia produtiva do agronegócio (ABRASCO, 2015). Esse processo levou o Brasil a tornar-se, desde 2008, o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, onde somente entre 2000 e 2012, o aumento do uso de agrotóxicos foi de 288%. Culturas como a soja, cana-de-açúcar, milho e algodão foram responsáveis por 80% dos agrotóxicos consumidos no Brasil em 2013 (ABRASCO, 2015) e conforme análise realizada pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA (2011), um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos.

Em relação a análise do histórico de regulamentação da contaminação da água, o dossiê da Associação Brasileira de Saúde Coletiva de 2015 traz a seguinte apreciação:

“Ao analisarmos de forma retrospectiva as portarias que regulam os parâmetros de potabilidade da água brasileira, verificamos um aumento dos parâmetros a serem monitorados. Na primeira norma de potabilidade da água do Brasil, a Portaria nº 56/1977, era permitida a presença de 12 tipos de agrotóxico, dez produtos químicos inorgânicos (metais pesados) e nenhum produto químico orgânico (solventes). [...] Na quarta e mais recente portaria, de nº 2.914/2011, é permitida a presença de 27 tipos de agrotóxico, 15 produtos químicos inorgânicos (metais pesados) e 15 produtos químicos orgânicos (solventes), além do uso de algicidas nos mananciais e estações de tratamento. A ampliação do número de substâncias químicas listadas na portaria que define os critérios de qualidade da água para o consumo humano reflete, ao longo do tempo, a crescente poluição do processo produtivo industrial que utiliza metais pesados e solventes e do processo agrícola

que usa dezenas de agrotóxicos e fertilizantes químicos. Essa ampliação pode levar à naturalização, e consequente banalização, da contaminação, como se essa grave forma de poluição fosse legalizada.”

Há muitas lacunas de conhecimento quando se trata de avaliar a multiexposição ou a exposição combinada a agrotóxicos. A grande maioria dos modelos de avaliação de risco serve para analisar apenas a exposição a um princípio ativo ou produto formulado, ao passo que no mundo real as populações estão expostas a misturas de produtos tóxicos cujos efeitos sinérgicos, ou de potencialização, são desconhecidos ou não são levados em consideração. Além da exposição mista, as vias de penetração no organismo também são variadas, podendo ser oral, inalatória e ou dérmica, simultaneamente. Essas concomitâncias não são consideradas nos estudos experimentais mesmo diante da possibilidade de que exposições por diferentes vias modifiquem a toxicocinética do agrotóxico, podendo torná-lo ainda mais nocivo (ABRASCO, 2015).

Não obstante a complexidade dos possíveis efeitos da exposição que todos os seres vivos inevitavelmente sofrem, por meio dos interessados no comércio de venenos, uma organização com o objetivo de interferir diretamente nas decisões do poder público, apoiados pelo lóbi político e bancada ruralista na construção da retórica da ocultação. Essa nada mais é do que tentativas de uso de artifícios retóricos elementares para dissimular a natureza nociva desses produtos. Por um lado, ela sugere que os agrotóxicos supostamente protegem os cultivos, enquanto por outro, oculta os efeitos deletérios desses produtos sobre a saúde humana e o meio ambiente. Um exemplo dessa artimanha é o projeto de lei (já arquivado) do deputado Álvaro Dias que propôs a alteração do nome “agrotóxico” pela expressão “produtos fitossanitários” na legislação brasileira, com a justificativa que a terminologia denigriria o sistema de produção agrícola. As noções de limite máximo de resíduos (LMR) ou de ingestão diária aceitável (IDA) também integram o amplo repertório de ocultação dos fatos. Ambas são derivadas de um enfoque cartesiano indevidamente aplicado a um objeto de estudo complexo como a toxicologia, mas extremamente funcional para transmitir a ideia de confiança em supostos limites de tolerância relacionados à contaminação por agrotóxicos dos alimentos e da água de consumo humano.”

Ao passo que os movimentos contrários as políticas agrárias de austeridade e os dados científicos embasem as discussões acadêmicas e civis, algumas medidas já estão pautadas como prioritárias no combate ao uso indiscriminado e irresponsável dos agroquímicos. As principais iniciativas tratam da suspensão das isenções de ICMS, PIS/Pasep, Cofins e IPI concedidas aos agrotóxicos (mediante o convênio 100/97, decreto 5.195/2004 e decreto 6.006/2006, respectivamente) e a externalização para a sociedade dos custos impostos pelas medidas de

assistência e reparação de danos. Além disso, é necessário proibir a pulverização aérea de agrotóxicos, controlar o desmatamento, rever os parâmetros de potabilidade da água, regulamentados pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, no sentido de limitar o número de substâncias químicas aceitáveis (agrotóxicos, solventes e metais) e diminuir os níveis dos seus valores máximos permitidos, assim como realizar a sua vigilância efetiva em todo o território nacional através do registro de mortes e intoxicações agudas e crônicas geradas pelos venenos.

Vários cientistas tentam provar que a capacidade predatória do ser humano está se aproximando do limite e que alguma ordem deve surgir do caos sendo, então, imprescindível um novo diálogo da sociedade com a natureza (Bernardes & Ferreira, 2015). A industrialização e o modo capitalista de produção não permitiu a soberania das comunidades mas implantou pelo poder do capital uma indústria em discordância com o bem estar e desenvolvimento humano. No contrassenso à agricultura convencional, discutida até agora, surge a Agricultura Alternativa com o objetivo de produzir alimentos de qualidade, respeitando o meio ambiente, mantendo a fertilidade do solo com a generalização da policultura e da integração da lavoura e da criação animal, e realizando, assim, o controle da erosão e a preservação da qualidade da água, criando soluções adequadas com vistas a atingir as causas e não os sintomas, valorizando o homem e seu trabalho (Matos, 2010).

Dentre as formas alternativas da agricultura a agroecologia desponta tanto como uma disciplina científica, como uma prática agrícola ou movimento social e político (ABA, 2017). A originalidade da proposta agroecológica recoloca a satisfação das necessidades antes da satisfação dos desejos e não se reduz ao não uso de químicos, mas abrange dimensões éticas, sociais e metodológicas mais amplas. Ela também propõe uma quebra de paradigma, pois procura diminuir a dependência e a produção de externalidades, desde a entrada de elementos externos ao sistema –insumos– até a saída de elementos internos ao sistema– poluição (AUBIN, 2017).

Além do interesse em conservação ambiental, sob vistas da questão ambiental, novas práticas conscientes e socialmente responsáveis, como a reforma agrária, são necessárias para assegurar a segurança alimentar e nutricional à população. Esse direito consiste no acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis. Como consequência da mudança da *práxis* em curso será possível alcançar a soberania alimentar que compreende-se como o direito dos povos a definir as suas próprias políticas e estratégias sustentáveis de produção, distribuição e consumo de alimentos, que garantam o direito à alimentação a toda a população, com base na pequena e média produção,

respeitando as suas próprias culturas e a diversidade dos modos camponeses de produção, de comercialização e de gestão. Apesar de parecer utópica, tais aspirações já fazem parte de sociedades desenvolvidas, como a Dinamarca, que está se tornando legalmente o primeiro país a ter apenas agricultura orgânica e biodinâmica.

MOVIMENTOS AMBIENTALISTAS E O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

A consciência da crise ambiental moderna se consolida, no final da década de 60 e começo da década de 70, com uma série de livros, congressos e encontros internacionais que puseram em pauta a necessidade de se rediscutir o desenvolvimento, devido aos danos que ele próprio estava gerando sobre a natureza externa (Foladori, 2002). O surgimento das ONGs foi uma das principais responsáveis pela popularização das questões ambientais, e essas surgiram amparadas em debates que vinham sendo realizados formalmente pelo menos desde o Clube de Roma, que em 1972, apresentou um dos cenários futuros mais pessimistas por meio do relatório “Os limites do desenvolvimento”. O principal problema da proposta do Clube foi a defesa do crescimento zero, na medida que impediria o crescimento dos países mais pobres. Esse pensamento, embasa uma das principais correntes ecológicas, a Neomalthusiana, que vê na superpopulação a principal causa do desastre planetário.

Um dos mais importantes eventos internacionais que envolveram a política ambiental e a tomada de consciência foi a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente, realizada em 1972, em Estocolmo. O desastre da Baía de Minamata no Japão, devido ao envenenamento de centenas de pessoas por mercúrio, foi o estopim para a reunião. Nessa conferência, o Brasil liderou a aliança dos países periféricos contrários a limitação do crescimento, porém, contraditoriamente foi um dos países que mais cedeu a transferência de indústrias poluentes do hemisfério norte (Ferreira, 1998). O encontro de Estocolmo rendeu a criação de importantes iniciativas como o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e a Comissão Mundial sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento (CMMAD). Esse último publicou, em 1987, o relatório “Nosso Futuro em Comum”, também conhecido como relatório de Brundtland, o qual foi o primeiro a trazer o conceito de desenvolvimento sustentável ao debate público e político. Pela proposta de desenvolvimento sustentável, este seria “aquele que atende às necessidades do presente sem comprometer a possibilidade de as gerações futuras atenderem às suas necessidades”. Quando esse conceito adquire força, as poucas dúvidas que ainda existiam, quanto à preocupação com a natureza e se devia ou não considerar o ser humano, se esvaecem (Foladori, 2002).

Embora os movimentos ambientalistas já vinham se organizando e alertando sobre os possíveis problemas que o descaso com as questões ambientais pudesses causar, isso não foi

suficiente para evitar diversos imprevistos. Os grandes acidentes ambientais que infelizmente aconteceram nessa época e foram amplamente noticiados, contribuíram no aprimoramento de uma crítica coletiva da população devido a seriedade das catástrofes e magnitude dos prejuízos ambientais. Como exemplos populares, podemos mencionar o acidente de 1984 na fábrica de pesticidas *Union Carbide* na cidade de Bhopal, na Índia, onde 40 km³ de gás tóxico foi liberado e aproximadamente 200 mil pessoas ficaram queimadas ou cegas, 10 mil morreram na hora e até hoje vítimas apresentam problemas respiratórios ou no aparelho digestivo. A sede da multinacional em questão é nos Estados Unidos, exemplificando claramente a transferência das externalidades através da prática do *offshoring* em países subdesenvolvidos, conforme discutido anteriormente. Igualmente infortúnio foi o derramamento de petróleo no Alasca, em 1989, onde o navio Exxon Valdez, após colisão, deixou vazar 40 milhões de litros de petróleo contaminando uma área de 4 km² (Bernardes & Ferreira, 2015).

A Conferência do Meio Ambiente e Desenvolvimento- ECO92, que aconteceu no Rio de Janeiro, foi, depois da reunião sueca, a grande marca da internacionalização definitiva da proteção ambiental e das questões relacionadas ao desenvolvimento, criando elementos como a Agenda 21 e o Fundo Global para o Meio Ambiente do Banco Mundial (Bernardes & Ferreira 2015). Além dessa, a conferência de 2012- Rio+20, também realizada no Brasil, foi considerada o maior evento já realizado pelas Nações Unidas, contando com a participação de chefes de Estado de 193 nações que propuseram mudanças, sobretudo no modo como estão sendo usados os recursos naturais do planeta. Além de questões ambientais, foram discutidos, durante o encontro, aspectos relacionados às questões sociais. O Brasil tem sido cenário de destaque e interesse internacional, especialmente considerando-se que entre 30 e 40% das florestas tropicais do mundo localizam-se na região amazônica e essa detém em sua biodiversidade o maior banco genético do planeta, participando com um terço do estoque genético global. Os encontros foram muito importantes para os debates, porém carecem de medidas práticas para a resolução efetiva dos problemas, pois a maioria dos percalços ambientais ainda persistem, uma vez que seu tratamento requer uma transformação nos meios de produção e consumo, bem como na organização social e de nossas vidas pessoais.

No Brasil, o processo acelerado de crescimento econômico das últimas décadas, levou ao surgimento de movimentos ambientalistas e consequentes políticas para enfrentamento da crise. Especialmente a partir da constituição de 1988, através das novas funções atribuídas ao Ministério público, destacando-se a sua atuação na tutela dos interesses difusos e coletivos (meio ambiente, patrimônio histórico e paisagístico, comunidades indígenas e minorias étnico-sociais), foi possível avançar no que tange assegurar a saúde ambiental e legislar sobre os infratores (Lopes, 2000). No entanto, as ações de proteção ambiental ainda permanecem fragmentadas e contraditórias,

ocupando um espaço periférico na dinâmica de funcionamento do sistema político e, também, na vida cotidiana da maioria do povo (Vieira, 2009). Já era enfatizado de longa data por alguns estudiosos que no Brasil a questão ecológica sempre esteve muito atrelada à justiça social. Segundo Minc (1987), a nação só terá um desenvolvimento ecologicamente viável em uma sociedade democrática, em que a população tenha de fato o poder sobre a organização da economia e do uso do espaço, além do poder de criar novos direitos que ampliem seus territórios de autonomia e liberdade.

Alguns autores vem discutindo as interfaces da sustentabilidade na sociedade, especialmente a inserção do homem como sujeito atuante nas causas e soluções das questões ambientais. Segundo Foladori (2002), quando se fala de meio ambiente em termos gerais se considera a natureza externa ao ser humano. Porém, toda a discussão sobre a crise ambiental moderna, e sobre uma alternativa ambientalmente mais saudável para o desenvolvimento humano, considera a sociedade humana como fazendo parte do meio ambiente. O próprio conceito de desenvolvimento sustentável incorpora à conservação da natureza externa, a sustentabilidade social e também uma sustentabilidade econômica. Faz-se portanto necessária a desnaturalização do conceito de ambiente, admitindo que o mesmo é resultado da interação da lógica da sociedade com a lógica da natureza, deve-se romper com a falsa separação entre desenvolvimento técnico científico e ecologia (Bernardes & Ferreira, 2015).

O desenvolvimento sustentável deve ser encarado de maneira holística e integral. Especialmente quando se discute a questão ambiental, não dá para considerar apenas os aspectos ambientais, pois isso é limitar o entendimento do objeto de estudo, que é a crise ambiental. Ela é provocado por diversos eventos e também cria diversas consequências, mais do que nunca no mundo contemporâneo onde tudo está globalmente interligado.

Uma das melhores formas de análise do tema é através da tridimensionalidade da sustentabilidade, ou seja, ecológica, econômica e social (Foladori, 2002). Em síntese, a sustentabilidade ecológica diz respeito a um certo equilíbrio e manutenção de ecossistemas, à conservação de espécies e à manutenção de um estoque genético, que garanta a resiliência ante impactos externos. O ambiente natural físico apresenta um limite em relação a atividades econômicas, em que as espécies e os ecossistemas deveriam ser utilizados de forma que lhes permitam continuar renovando-se indefinidamente (Anand & Sen, 2000). Já a sustentabilidade econômica, em geral, fica restrita ao crescimento econômico e à eficiência produtiva. Porém, um crescimento ilimitado, como aquele comandado pelo sistema capitalista, é incongruente com a sustentabilidade ambiental. Uma das medidas para o ajuste da economia seria corrigir os processos produtivos para obter um desenvolvimento capitalista sustentável. Prioritariamente, seria o caso

de substituir de forma crescente os recursos naturais não-renováveis por renováveis, e diminuir também progressivamente a poluição.

No que se refere ao aspecto social, até a década de 90, duas temáticas concentravam essa discussão, a pobreza e o incremento populacional. No entanto, essa vertente pode ser vista como uma questão em si e como um desdobramento para a parte ecológica. Como exemplo, pode ser usado o crescimento populacional. Os pobres se reproduzem mais, visto que os dados da ONU apontam para maior natalidade em países subdesenvolvidos, nesse caso, o problema de insustentabilidade social é o crescimento da pobreza, e assim o aumento da população pressiona os recursos e incrementa os resíduos. Ou seja, a sustentabilidade social é utilizada na medida em que se constitui um elemento que afeta a sustentabilidade ecológica, porém o problema social *per se* deveria ser motivação suficiente para que mudássemos o paradigma de como vivemos e nos relacionamos continuamente com o mundo. Tanto a pobreza quanto a degradação ambiental podem ter uma mesma causa que é a falta de recursos ou de direitos de propriedade sobre esses recursos. Foladori (2002) exhibe que existem certas barreiras, colocadas pela própria lógica do funcionamento do sistema capitalista, que limitam a viabilidade da sustentabilidade social. Exemplos de sociedades agrícolas menos integradas ao mercado mostram um maior equilíbrio ambiental, então a degradação poderia vir com a integração mercantil.

A compreensão de que o incremento das capacidades humanas é a principal mudança a respeito da relação entre pobreza e meio ambiente torna-se cada vez mais profunda. O aumento da qualidade de vida deve ser o objetivo e não a ponte ou o meio para uma natureza mais saudável. Assim, o desenvolvimento humano, como objetivo próprio, se coloca em primeiro lugar e, na medida que esse avança, haveria um melhor relacionamento com o ambiente externo. Essa discussão tem a ver com a diferença entre garantir às futuras gerações um ambiente melhor, ou garantir melhores gerações. No entanto, durante os últimos trinta anos, a discussão sobre o desenvolvimento sustentável colocou ênfase na necessidade de legar às futuras gerações uma natureza melhor, enquanto o aumento da qualidade de vida era percebido como um mero meio para atingir aquela meta (Anand & Sen, 2000).

Autores como Ignacy Sachs (2000) englobam outros critérios de sustentabilidade na lógica multifatorial da questão, onde aspectos como sustentabilidade cultural, territorial e política também são contemplados, além do tripé ecológico-econômico-social. Essa abordagem é coerente com as mais recentes propostas da Organização das Nações Unidas para o alcance global do desenvolvimento sustentável. Em 2015, mais de 150 líderes mundiais reuniram-se na sede da ONU, em Nova York, para adotar formalmente uma nova agenda de desenvolvimento sustentável. Esta é formada pelos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que devem ser

implementados, através de uma aliança global, por todos os países do mundo durante os próximos 15 anos, até 2030.

Segundo esse ementário o desenvolvimento sustentável poderá ser alcançado através da erradicação da pobreza, promoção da educação acessível e de qualidade a todos, substituição progressiva da matriz energética global, redução das desigualdades de classe e gênero, combate as mudanças climáticas, conservação da biodiversidade e dos recursos ambientais, além da promoção da paz e justiça, dentre outros.

Esta Agenda é um plano de ação para as pessoas, para o planeta e para a prosperidade, onde as medidas ousadas e transformadoras são urgentemente necessárias para direcionar o mundo para um caminho sustentável e resiliente. Os 17 ODS e 169 metas anunciadas, foram construídas sobre o legado dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio e concluirão o que estes não conseguiram alcançar. Eles são aplicáveis a todos os países, levando em conta as diferentes realidades nacionais, capacidades e níveis de desenvolvimento e respeitando as políticas e prioridades nacionais. Estes são objetivos e metas universais, integrados e indivisíveis, e equilibram as três dimensões básicas do desenvolvimento sustentável (ONU, 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A visão dialética do materialismo histórico é, sem dúvidas, uma das formas de enxergar as relações sociedade-natureza no pensamento ocidental. Esse enfoque valoriza o papel das relações econômicas na sociedade e possibilita uma compreensão mais clara dos atuais problemas ambientais, embora o modelo de interesses e de relações de poder tenham se modificado profundamente na fase capitalista contemporânea.

O progresso industrial e tecnológico ascendente e em desacordo com os aspectos ecológicos e sociais de sustentabilidade, estimula a demanda pela investigação crítica dos efeitos desses eventos no ambiente e na construção social. Especialmente com a unificação das indústrias químicas em grandes corporações transnacionais, o ramo dos produtos que geram doenças, notadamente os químicos e agrotóxicos, articulou-se comercialmente ao ramo dos produtos que supostamente curam, os medicamentos, dominando assim os mercados globais e criando uma dependência compulsória de tais serviços e produtos. Com isso, a degradação ambiental, os contaminantes emergentes e o aumento populacional contribuem, em conjunto, para o agravamento do colapso que entendemos como crise ambiental, mas que, segundo a óptica da questão ambiental, envolve também os aspectos sociais, políticos e econômicos.

Faz-se necessário um aprofundamento consciente no julgamento sobre os modelos lineares e precários da cadeia produtiva industrial, que se baseiam na exploração indiscriminada dos

recursos naturais e humanos, bem como o questionamento sobre a real necessidade de desenvolvimento, bem como o tipo de desenvolvimento que buscamos alcançar, e para quem ele é endereçado.

O século XXI continuará sendo marcado por diversas fases de transição e caberá a todos o desafio permanente da ecologização do pensamento, conforme proposta do filósofo Edgar Morin. Esse afirma a necessidade de novas reflexões diante do fato de que a nossa cultura e a nossa civilização baseiam-se em valores e visões de mundo dissociadas das leis da natureza, sendo essa uma visão antropocêntrica que resulta na crescente degradação ambiental, acumulação de resíduos e perda de biodiversidade. Isso significa adotar uma ação de introduzir a dimensão ecológica nos vários campos da vida e da sociedade, em busca de um desenvolvimento que seja de fato justo, sustentável e permanente.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As nanopartículas estudadas nesse trabalho representam apenas uma classe dos muitos tipos de contaminantes que são sintetizados e comercializados atualmente. Teoricamente, todas as novas substâncias químicas produzidas deveriam ter seus riscos analisados tendo em vista o princípio da precaução, que refere-se a um cuidado antecipado que é necessário devido ao desconhecimento dos possíveis efeitos nocivos que esse composto poderia causar a qualquer organismo vivo, quando exposto. Acontece que a carência de fiscalização e legislação adequada faz com que os níveis de poluição e degradação ambiental aumentem drasticamente, afetando especialmente as espécies mais vulneráveis.

O ser humano tem uma responsabilidade adicional em relação a manutenção da qualidade dos ecossistemas para a manutenção plena dos seres vivos. Ocupamos e interferimos em praticamente todos os espaços globais, desse modo, somos tanto os principais responsáveis pelo colapso ambiental bem como vítimas. Nesse contexto desolador, porém inevitável, nossos dados são um alerta adicional para que estejamos mais cientes dos efeitos que o processo produtivo industrial desenfreado pode causar aos seres vivos e ao planeta. Estudos ecotoxicológicos são de grande relevância para o movimento conservacionista-ambientalista por embasarem a discussão formal e política do tema e formar a corrente de contracultura que instiga a reflexão acerca de um modelo de desenvolvimento global pensado para as pessoas e para o planeta, e não para o capital.

Especialmente no Brasil, onde não há muitos institutos de pesquisa, as universidades tem um papel importante na investigação e monitoramento da qualidade ambiental. Nesse processo, possibilita a formação acadêmica crítica e nos faz pensar melhor sobre nosso papel na sociedade como pesquisador e produtor de informação científica bem como como cidadão e difusor das ideias voltadas a um desenvolvimento sustentável, ecologicamente equilibrado e socialmente justo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol, 105: 121-126.
- ALBER, F., DOKUDOVSKAYA, S., VEENHOFF, L.M., ZHANG, W., KIPPER, J., DEVOS, D., SUPRAPTO, A., KARNI-SCHMIDT, O., WILLIAMS, R., CHAIT, B.T., SALI, A., ROUT, M.P., 2007. The molecular architecture of the nuclear pore complex. Nature 450, 695–701.
- ANAND, Sudhir; SEN, Amartya. Human development and economic sustainability. World Development, Oxford: Pergamon, v. 28, n. 12, p. 2029-2049, 2000.
- ARCAUTE, C.R.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 128, 222-229. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.027>
- ARMAND, L., TARANTINI, A., BEAL, D., BIOLA-CLIER, M., BOBYK, L., SORIEUL, S., PERNET-GALLAY, K., MARIE-DESVERGNE, C., LYNCH, I., HERLIN-BOIME, N., CARRIERE M., 2016. Long-term exposure of A549 cells to titanium dioxide nanoparticles induces DNA damage and sensitizes cells towards genotoxic agents. Nanotoxicology 10(7), 913–23.
- AUBIN, LUDOVIC. 2017. O paradigma agroecológico e as crises da sociedade contemporânea: contribuições socioantropológicas na perspectiva da teoria mimética. Desenvolvimento e Meio Ambiente, vol. 41, p. 270-294. DOI: 10.5380/dma.v41i0.51341
- BERNARDES, J.A. & FERREIRA, F.P.M. 2015. Sociedade e Natureza. In. A questão ambiental: diferentes abordagens/ Sandra Baptista da Cunha, Antonio José Teixeira Guerra (Org.). 9ª ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 250 p.
- BLINDER, A. S. 2006. Offshoring: The Next Industrial Revolution? Foreign Affairs, vol. 85, n. 2, 113-128. <http://dx.doi.org/10.2307/20031915>
- BOFF, L. 2015. O capitalismo será derrotado pela Terra. Disponível em: <<https://leonardoboff.wordpress.com/2015/11/27/o-capitalismo-sera-derrotado-pela-terra/>>. Acesso em Outubro de 2017.
- BOLS, N.C., DAYEH, V.R., LEE, L.E.J., SCHIRMER, K., 2005. Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochem. Mol. Biol. Fishes 6, 43–84.
- BRADFORD, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem, 72: 248-254.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Subsídios para construção da política nacional de saúde ambiental- Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 56 p.: il., 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Política nacional de saúde ambiental para o setor saúde*. Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde, 1999.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Agenda 21*. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=18&idConteudo=908>>. Acesso em: 10 set. 2015.

BRESSER-PEREIRA, LUIZ CARLOS. 2014. Desenvolvimento, Progresso e Crescimento Econômico. Lua Nova, São Paulo, 93: 33-60.

BURKE, M.D. & MAYER, R.T. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos*, 2(6): 583-588.

CAPRA, FRITJOF. 1982. O ponto de mutação. Editora Pensamento- Cultrix, São Paulo. 350p.

CARNEIRO, FERNANDO FERREIRA (Org.). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde / Organização de Fernando Ferreira Carneiro, Lia Giraldo da Silva Augusto, Raquel Maria Rigotto, Karen Friedrich e André Campos Búrigo. - Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p. : il.

CASTAÑO, A., BOLS, N., BRAUNBECK, T., DIERICKX, P., HALDER, M., KAWAHARA, K., LEE, L.E.J., MOTHERSILL, C., PÄRT, P., SINTES, J.R., RUFLI, H., SMITH, R., WOOD, C., 2003. The Use of Fish Cells in Ecotoxicology 317–351.

CAVALCANTI, Clóvis (Org.) Sustentabilidade da Economia: paradigmas alternativos de realização econômica. In. *Desenvolvimento e Natureza: Estudos para uma sociedade sustentável*. Recife: INPSO/FUNDAJ, out. 1994b. p. 153-176. Disponível em: <http://www.ufbaecologica.ufba.br/arquivos/livro_desenvolvimento_natureza.pdf>. Acesso em: 23/09/2015.

CERKEZ, I., KOCER, H.B., WORLEY, S.D., BROUGHTON, R.M., HUANG, T.S., 2011. Multifunctional Cotton Fabric : Antimicrobial and Durable Press. *Journal of Applied Polymer Science* 124, 4230–4238.

CHEMICAL ABSTRACT SERVICE. 2017. CAS REGISTRY database. Disponível em: <www.cas.org>. Acesso em Novembro de 2017.

CIMBALUK, G.V., RAMSDORF, W.A., PERUSSOLO, M.C., SANTOS, H.K.F., SILVA DE ASSIS, H.C., SCHNITZLER, M.C., SCHNITZLER, D.C., CARNEIRO, P.G., CESTARI, M.M., 2018. Evaluation of multiwalled carbon nanotubes toxicity in two fish species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 150, 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.034>

CLEMENTE, Z., CASTRO, V.L., JONSSON, C.M. & FRACETO, L.F. 2012. Ecotoxicology of Nano-TiO₂- An Evaluation of its Toxicity to Organisms of Aquatic Ecosystems. *Int. J. Environ Res*, 6(1): 33-50.

COLLINS, A.R., DOBSON, V.L., DUŠINSKÁ, M., KENNEDY, G. & ŠTĚTINA, R. 1997. The comet assay: What can it really tell us? *Mutat Res*, 375: 183–193. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00013-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00013-4)

COSTA, M., 1991. DNA-protein complexes induced by chromate and other carcinogen. *Environmental Health Perspectives* 92, 45–52.

COSTA, P.M. 2011. Avaliação do efeito tóxico de sulfato de alumínio e sulfato de cobre em bioensaio de contaminação subcrônica via trófica no bioindicador *Rhamdia quelen* (Siluriforme). PhD Thesis. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 117p.

COUTINHO, L. 2017. O futuro da indústria. Carta IEDI- Instituto de Estudos para o Desenvolvimento Industrial. Disponível em: <<http://www.iedi.org.br/>>. Acesso em Outubro de 2017.

CRANE, M., HANDY, R.D., GARROD, J. & OWEN, R. 2008. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17: 421-437. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0215-z>

DUSINSKA, M., and COLLINS, A.R., 2008. The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23(3), 191–205.

ERTHAL, RUI. 2000. A colonização portuguesa no Brasil e a pequena propriedade. *GEOgraphia*, Ano II, nº4, 49-75.

FAIRBAIRN, D.W., OLIVE, P.L. and O'NEILL, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 339(1), 37–59

FEDERICI, G., SHAW, B.J. & HANDY, R.D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat Toxicol*, 84: 415-430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>

FERRARO, M.V.M., FENOCCHIO, A.S., MANTOVANI, M.S., RIBEIRO, C.O. & CESTARI, M.M. 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genet Mol Biol*, 27(1): 103-2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572004000100017>

FERREIRA, L.C. 1998. A questão ambiental. São Paulo: Jinkings, 1 ed., 154 p..

FLEURY, A. 2017. O Futuro da Indústria. Instituto de Estudos para o Desenvolvimento Industrial. Disponível em: <<http://www.iedi.org.br/>>. Acesso em Outubro de 2017.

FOLADORI, GUILLERMO. 2002. Avanços e limites da sustentabilidade social. *Revista Paranaense de Desenvolvimento*, Curitiba, n. 102, 103-113.

GAILLET, S., and ROUANET, J.-M., 2015. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms — A review. *Food and Chemical Toxicology* 77, 58–63.

GAMELIN, F.X., BAQUET, G., BERTHOIN, S., THEVENET, D., NOURRY, C., NOTTIN, S. & BOSQUET, L. 2009. Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol*, 105: 731-738. <http://dx.doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

GAO, R., YUAN, Z. & ZHAO, Z. 1998. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem Bioenerg*, 45: 41-45. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(98\)00072-5](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00072-5)

GIRARDI, EDUARDO PAULON. 2017. Atlas da Questão Agrária Brasileira. Disponível em: <http://www2.fct.unesp.br/nera/atlas/caracteristicas_socioeconomicas_b.htm>. Acesso em Novembro de 2017.

GOKSOYR, A. 1995. Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol*, 17: 80-95.

GONTIJO, A.M., BARRETO, R.E., SPEIT, G., VALENZUELA REYES, V.A., VOLPATO, G.L. & FAVERO SALVADORI, D.M. 2003. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. *Mutat Res*, 534: 165–72. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00276-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00276-0)

GRAND VIEW RESEARCH- GVR. 2017. Nanoparticle TiO₂ Market Analysis, Market Size, Application Analysis, Regional Outlook, Competitive Strategies and Forecasts, 2014 To 2020. Market Research Reports, ID 610. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nanoparticle-tio2-market>>. Acesso em Outubro de 2017.

GRANDE VIEW RESEARCH. 2017. Nano Metal Oxide Market Analysis By Product (Aluminum Oxide, Iron Oxide, Titanium Dioxide, Silicon Dioxide, Zinc Oxide) By Applications (Electronics, Personal Care, Paints & Coatings), And Segment Forecasts, 2014 – 2025. Report ID: GVR-1-68038-806-0. Disponível em: <<http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nano-metal-oxide-nmo-market>>. Acesso em Outubro de 2017.

GROSELL, M.H., HOGSTRAND, C. & WOOD, C.M. 1998. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*, 40: 275–91. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00026-X)

HANDY, R.D., HENRY, T.B., SCOWN, T.M., JOHNSTON, B.D. & TYLER, C.R. 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish — a mechanistic analysis. *Ecotoxicology*, 17: 396–409. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0205-1>

HARTMANN, A., HERKOMMER, K., GLÜCK, M., SPEIT, G., 1995. DNA-Damaging Effect of Cyclophosphamide on Human Blood Cells *In vivo* and *In vitro* Studied With the Single-Cell Gel Test (Comet Assay). *Environ. Mol. Mutagen*. 87, 180–187.

HUDECOVÁ, A., KUSZNIEREWICZ, B., RUNDÉN-PRAN, E., MAGDOLENOVÁ, Z., HAŠPLOVÁ, K., RINNA, A., FJELLSBØ, L.M., KRUSZEWSKI, M., LANKOFF, A., SANDBERG, W.J., REFSNES, M., SKULAND, T., SCHWARZE, P., BRUNBORG, G., BJØRAS, M., COLLINS, A., MIADOKOVÁ, E., GÁLOVÁ, E., DUŠINSKÁ, M., 2012. Silver nanoparticles induce premutagenic DNA oxidation that can be prevented by phytochemicals from *Gentiana asclepiadea*. *Mutagenesis* 1–11.

HUK, A., IZAK-NAU, E., REIDY, B., BOYLES, M., DUSCHL, A., LYNCH, I., DU, M., 2014. Is the toxic potential of nanosilver dependent on its size? Part. *Fibre Toxicol*. 11, 1–16.

IGLESIAS, T., LÓPEZ DE CERAIN, A., IRACHE, J.M., MARTÍN-ARBELLA, N., WILCOX, M., PEARSON, J., AZQUETA, A., 2017. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mucus permeation capacity of several surface modified poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery. *Int. J. Pharm*. 517, 67–79.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. 2017. Nova proposta de classificação territorial mostra um Brasil menos urbano. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/>>. Acesso em Novembro de 2017.

INSTITUTO DE ESTUDOS PARA O DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL- IEDI. 2017. Indústria Mundial: O Brasil na contramão dos emergentes. Carta IEDI, edição 809. Disponível em: <http://www.iedi.org.br/cartas/carta_iedi_n_809.html>. Acesso em Outubro de 2017.

JEMEC, A., DROBNE, D., TISLER, T. & SEPCIC, K. 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies- lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res Int*, 17 (3): 571-581. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0112-x>

JONES, C.F. & GRAINGER, D.W. 2009. *In vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev*, 61: 438-456. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.005>

JOVANOVIĆ, B. & PALIC, D. 2012. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish- Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquat Toxicol*, 118: 141-151. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.04.005>

KAIN, J., KARLSSON, H.L. & MÖLLER, L. 2012. DNA damage induced by micro- and nanoparticles- interaction with FPG influences the detection of DNA oxidation in the comet assay. *Mutagenesis*, 27 (4): 491-500. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges010>

KARAKAYA, A., JARUGA, P., BOHR, V.A., GROLLMAN, A.P., DIZDAROGLU, M., 1997. Kinetics of excision of purine lesions from DNA by *Escherichia coli* Fpg protein. *Nucleic Acids Res.* 25, 474-479.

KAUR, A. & GRUPTA, U. 2009. A review on applications of nanoparticles for the pre concentration of environmental pollutants. *J Mater Chem*, 19: 8279-8289.

KEEN, J.H., HABIG, W.H. & JAKOBY, W.B. 1976. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferase. *J Biol Chem*, 251: 6183-6188.

KELLER, A.A., MCFERRAN, S., LAZAREVA, A. & SUH, S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res*, 15: 1692. <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1692-4>

KERMANIZADEH, A., GAISER, B.K., HUTCHISON, G.R., STONE, V., 2012. An *in vitro* liver model - assessing oxidative stress and genotoxicity following exposure of hepatocytes to a panel of engineered nanomaterials. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 1-13.

KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTRIJM, G., 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* 363, 89-96.

KLINGELFUS, T., COSTA, P.M., SCHERER, M. & CESTARI, M.M. 2015. DNA damage in the kidney tissue cells of the fish *Rhamdia quelen* after trophic contamination with aluminium sulfate. *Genet Mol Biol*, 38 (4): 499-506. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420140327>.

- KLINGELFUS, T., LIROLA, J.R., OYA SILVA, L.F., DISNER, G.R., VICENTINI, M., NADALINE, M.J.B., ROBLES, J.C.Z., TREIN, L.M., VOIGT, C.L., SILVA DE ASSIS, H.C., MELA, M., LEME, D.M., CESTARI, M.M., 2017. Acute and long-term effects of trophic exposure to silver nanospheres in the central nervous system of a neotropical fish *Hoplias intermedius*. *NeuroToxicology* 63, 146–154.
- KOPPEN, G., AZQUETA, A., POURRUT, B., BRUNBORG, G., COLLINS, A.R., LANGIE, S.A.S., 2017. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 0, 1–12.
- KRUSZEWSKI, M., GRADZKA, I., BARTŁOMIEJCZYK, T., CHWASTOWSKA, J., SOMMER, S., GRZELAK, A., ZUBEREK, M., LANKOFF, A., DUSINSKA, M., WOJEWÓDZKA, M., 2013. Oxidative DNA damage corresponds to the long term survival of human cells treated with silver nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 219, 151–159.
- KUMAR, A., PANDEY, A.K., SINGH, S.S., SHANKER, R. & DHAWAN, A. 2011. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. *Chemosphere*, 83: 1124-1132. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.025>
- KUMARAVEL, T.S., VILHAR, B., FAUX, S.P., JHA, A.N., 2009. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25, 53–64.
- KURZ, R. 2001. Natureza em ruínas. Folha de São Paulo (17/06/2001). Disponível em: < <https://arlindenor.com/2016/08/10/natureza-em-ruinas-robert-kurz/>>. Acesso em Outubro de 2017.
- LAVICOLI, L., LESO, V., FONTANA, L. & BERGAMASCHI, A. 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15 (5): 481-508.
- LEME, D.M., OLIVEIRA, G.A.R., MEIRELES, G., SANTOS, T.C., ZANONI, M.V.B., OLIVEIRA, D.P., 2014. Genotoxicological assessment of two reactive dyes extracted from cotton fibres using artificial sweat. *Toxicol. Vit.* 28, 31–38.
- LILLICRAP, A., BELANGER, S., BURDEN, N., PASQUIER, D. Du, EMBRY, M.R., HALDER, M., LAMPI, M. a., LEE, L., NORBERG-KING, T., RATTNER, B. A., SCHIRMER, K., THOMAS, P., 2016. Alternative approaches to vertebrate ecotoxicity tests in the 21st century: A review of developments over the last 2 decades and current status. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2637–2646.
- LINHUA, H., WANG, Z. & XING, B. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*). *J Environ Sci*, 21 (10): 1459-1466. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62440-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62440-7)
- LOPES, J. A. V. Democracia e cidadania: o novo Ministério Público. Rio de janeiro: Lumen Juris, 2000.
- LOVATTO, P.B.; ALTEMBURG, S.N.; CASALINHO, H.; LOBO, E.A. Ecologia profunda: o despertar para uma educação ambiental complexa. *REDES*, Santa Cruz do Sul, v.16, n.3, p. 122-137, set/dez 2011.

LOVATTO, P; PREVIDI, J. A Questão Racial no Brasil: biologia, sustentabilidade e construção social. Revista Ágora do Dep. de História e Geografia da UNISC. n. 14 v. 1, 2008.

MALVERN INSTRUMENTS Ltd. 2005. Zetasizer Nano Series- User manual. Nano 317, issue 2.2, Worcestershire, United Kingdom.

MARAMBIO-JONES, C., and HOEK, E.M.V., 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research 12, 1531–1551.

MATOS, ALAN KARDEC VELOSO. 2010. Revolução verde, biotecnologia e tecnologias alternativas. Cadernos da FUCAMP, v.10, n.12, p.1-17.

MERK, O., and SPEIT, G., 1999. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. Environmental and molecular mutagenesis 33, 167–172.

MINC, C. (1987). Os desafios da Ecopolítica no Brasil. In: PÁDUA, J.A. Ecologia e política no Brasil. Rio de Janeiro: IUPERJ.

MORAES, JOSÉ GERALDO VINCI. 2003. História: geral e Brasil. Volume único, 1. Ed. São Paulo: Atual. 496 p.

MOREIRA, Roberto José. 2000. Críticas ambientalistas à Revolução Verde. Revista Estudos Sociedade e Agricultura. v.15, p.39-52.

NAKAGAWA, Y., WAKURI, S., SAKAMOTO, K. & TANAKA, N. 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. Mutat Res, 394: 125-132. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(97\)00126-5](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00126-5)

NOLL, D.M., MASON, T.M., and MILLER, P.S., 2006. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. Chemical reviews 106(2), 277–301.

OECD, 2014. *In vivo* mammalian alkaline comet assay. Series on Guideline for the testing of chemicals, TG 489. OECD Publishing.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS- ONU. 2015. Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>>. Acesso em Agosto de 2017.

OSTLING, O. and JOHANSON, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and biophysical research communications 123(1), 291–298.

PAGLIA, D.E. & VALENTINE, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med, 70 (1): 158–169.

PETERS, R., BRANDHOFF, P., WEIGEL, S., MARVIN, H., BOUWMEESTER, H., ASCHBERGER, K., RAUSCHER, H., AMENTA, V., ARENA, M., BOTELHO, F., GOTTARDO, S., MECH, A., 2014. Inventory of Nanotechnology applications in the agricultural, feed and food sector. EFSA Support. Publ. 125.

PETKOVIĆ, J., ŽEGURA, B., STEVANOVIĆ, M., DRNOVŠEK, N., USKOKOVIĆ, D., NOVAK, S., FILIPIĆ, M., 2011. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology* 5, 341–353.

PFUHLER, S., and WOLF, H.U., 1996. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and molecular mutagenesis*, 27, 196–201.

PICCINNO, F.; GOTTSCHALK, F.; SEEGER, S.; NOWACK, B. 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14:1109. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>

POMPELLA, A., VISVIKIS, A., PAOLICCHI, A., TATA, V. & CASINI, F. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*, 66: 1499-1503. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00504-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00504-5)

RAMSDORF, W.A., FERRARO, M.V.M., OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A., COSTA, J.R.M. & CESTARI, M.M. 2009. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. *Environ Monit Assess*, 158: 77-85. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0566-1>

REEVES, J.F., DAVIES, S.J., DODD, N.J.F. & JHA, A.N. 2008. Hydroxyl radicals (·OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat Res*, 640 : 113-122. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010>

RIBEIRO, H. Saúde pública e meio ambiente: evolução do conhecimento e da prática, alguns aspectos éticos. *Saúde e Sociedade* 13 (1), 70-80, 2004.

RINNA, A., MAGDOLENOVA, Z., HUDECOVA, A., KRUSZEWSKI, M., REFSNES, M., DUSINSKA, M., 2015. Effect of silver nanoparticles on mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage. *Mutagenesis* 30, 59–66.

ROSENFELDT, R.R., SEITZ, F., ZUBROD, J.P., FECKLER, A., MERKEL, T., LÜDERWALD, S., BUNDSCHUH, R., SCHULZ, R. & BUNDSCHUH, M. 2015. Does the presence of titanium dioxide nanoparticles reduce copper toxicity? A factorial approach with the benthic amphipod *Gammarus fossarum*. *Aquat Toxicol*, 165: 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.011>

ROSSI, S.C., MELA, M., BOSCHEN, S.L., CUNHA, C., FILIPAK NETO, F., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., NEVES, A.P.P. & SILVA DE ASSIS, H.C. 2014. Modulatory effect of nano TiO₂ on Pb in *Hoplias malabaricus* trophically exposed. *Environ Toxicol Pharmacol*, 38: 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.013>

RYBAK M., KOŁODZIEJCZYK A., JONIAK T., RATAJCZAK I. & GABKA M. 2017. Bioaccumulation and toxicity studies of macroalgae (Charophyceae) treated with aluminium : Experimental studies in the context of lake restoration. *Ecotoxicol Environ Saf*, 145 : 359-366. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.056>

SACHS, IGNACY. 2000. Caminhos para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: Garamond. 96p.

SACHS, Ignacy. 2004. *Desenvolvimento*: includente, sustentável, sustentado. Rio de Janeiro: Garamond.

SAGHAZADEH A. & REZAEI N. 2017. Systematic review and meta-analysis links autism and toxic metals and highlights the impact of country development status : Higher blood and erythrocyte levels for mercury and lead, and higher hair antimony, cadmium, lead, and mercury. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 79 : 340-368. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.011>

SCHENCK, ROGER. 2011. CAS REGISTRY: Maintaining the gold standard for chemical substance information. American Chemical Society Meeting, Spring 2011.

SCOWN, T.M., AERLE, R., JOHNSTON, B.D., CUMBERLAND, S., LEAD, J.R., OWEN, R. & TYLER, C.R. 2009. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidney of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. *Toxicol Sci*, 109(2): 372-380. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp064>

SEDLAK, J. & LINDSAY, R.H. 1968. Estimation of total protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 21(1): 192-205.

SHAW, B.J. & HANDY, R.D. 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals *versus* metal ions. *Environ Int*, 37: 1083-1097. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.009>

SIES, H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*, 27 (9/10): 916-921.

SINGH, N.P., McCOY, M.T., TICE, R.R. & SCHNEIDER, E.L.A. 1988. Simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175: 184-191.

SMITH, C.C., DONOVAN, M.R.O., and MARTIN, E.A., 2006. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 21(3), 185-190.

SPEIT, G., SCHÜTZ, P., BONZHEIM, I., TRENTZ, K., HOFFMANN, H., 2004. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol. Lett.* 146, 151-158.

STARK, W.J., STOESSEL, P.R., WOHLLEBEN, W., HAFNER, A., 2015. Industrial applications of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 44, 5793-5805.

SUN, H., ZHANG, X., NIU, Q., CHEN, Y. & CRITTENDEN, J.C. 2007. Enhanced accumulation of arsenate in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Water Air Soil Pollut*, 178: 245-54. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9194-y>

SUN, T.Y., GOTTSCHALK, F., HUNGERBÜHLER, K. & NOWACK, B. 2014. Comprehensive probabilistic modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ Pollut*, 185: 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>

TAN, C. & WANG, W.X. 2017. Influences of TiO₂ nanoparticles on dietary metal uptake in *Daphnia magna*. *Environ Pollut*, 231: 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.024>

TAVARES, A.M., LOURO, H., ANTUNES, S., QUARRÉ, S., SIMAR, S., TEMMERMAN, P.J., VERLEYSSEN, E., MAST, J., JENSEN, K.A., NORPPA, H., NESSLANY, F. & SILVA, M.J. 2014. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicol In Vitro*, 28: 60-69. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.009>

THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. <http://www.nanotechproject.org/cpi> (accessed 18.01.20).

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J., SASAKI, Y.F., 2000. Single cell gel / Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(3), 206–221.

UNITED NATIONS, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP/248.

URBAN, T. Saudade do matão: relembrando a história da conservação da natureza no Brasil. Curitiba- Editora da UFPR; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza; Fundação MacArthur. 374p.: il., 1998.

US FDA (Food and Drug Administration). 2014. Guidance for Industry- Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm257698.htm>.

VALES, G., RUBIO, L., and MARCOS, R., 2015. Long-term exposures to low doses of titanium dioxide nanoparticles induce cell transformation, but not genotoxic damage in BEAS-2B cells. *Nanotoxicology* 9(5), 568–78.

VANCE, M.E., KUIKEN, T., VEJERANO, E.P., MCGINNIS, S.P., HOCELLA, M.F., REJESKI, D. & HULL, M.S. 2015. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol*, 6: 1769-1780. <http://dx.doi.org/10.3762/bjnano.6.181>

VEVERS, W.F., and JHA, A.N., 2008. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells *in vitro*. *Ecotoxicology (London, England)* 17(5), 410–20.

VIEIRA, P.F. (2009). Políticas ambientais no Brasil: do preservacionismo ao desenvolvimento territorial sustentável. *Política & Sociedade*, nº 14, p 27-75.

VIGNARDI, C.P., HASUE, F.M., SARTÓRIO, P.V., CARDOSO, C.M., MACHADO, A.S.D., PASSOS, M.J.A.C.R., SANTOS, T.C.A., NUCCI, J.M., HEWER, T.L.R., WATANABE, I.S., GOMES, V. & PHAN, N.V. 2015. Genotoxicity, potential cytotoxicity and cell uptake of titanium dioxide nanoparticles in the marine fish *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766). *Aquat Toxicol*, 158: 218-229. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.11.008>

WANG, G., JIN, W., QASIM, A.M., GAO, A., PENG, X., LI, W., FENG, H. & CHU, P.K. 2017. Antibacterial effects of titanium embedded with silver nanoparticles based on electron-transfer-induced reactive oxygen species. *Biomaterials*, 124: 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.028>

WILDE, Robert. 2017. Population Growth and Movement in the Industrial Revolution. Thought.Co: History and Culture. <https://www.thoughtco.com>

WORLD NUCLEAR ASSOCIATION. 2014. History of Nuclear Energy. Disponível em: <<http://www.world-nuclear.org/information-library/current-and-future-generation/outline-history-of-nuclear-energy.aspx>>. Acesso em Outubro de 2017

WU, B., LI, X., SONG, J., HU, L. & SHI, X. 2016. Impact of extreme metal contamination at the supra-individual level in a contaminated bay ecosystem. *Sci Total Environ*, 102-9: 557-558. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.047>

XIONG, D., FANG, T., YU, L., SIMA, X. & ZHU, W. 2011. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Sci Total Environ*, 409: 1444-1452. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>

ZHANG, X., SUN, H., ZHANG, Z., NIU, Q., CHEN, Y. & CRITTENDEN, J.C. 2007. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. *Chemosphere*, 67: 160-166. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.003>

ZHU, M., NIE, G., MENG, H., XIA, T., NEL, A., ZHAO, Y., 2012. Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. *Accounts Chemical Res.* 46, 622–631.

APÊNDICE



Exemplar da espécie *Hoplias intermedius* utilizado como modelo dos estudos *in vivo*.

OUTROS RESULTADOS DOS EXPERIMENTOS COM *Hoplias intermedius*

Aqui são apresentados resultados adicionais obtidos pelo mesmo experimento detalhado no artigo acima, cuja metodologia não será repetida. Serão apresentados resultados referentes ao teste do cometa em outros tecidos do peixe (eritrócitos, rim e cérebro) que, segundo nossas análises, não sofreram alteração quanto a quebra do DNA após exposição as nanopartículas de Dióxido de Titânio.

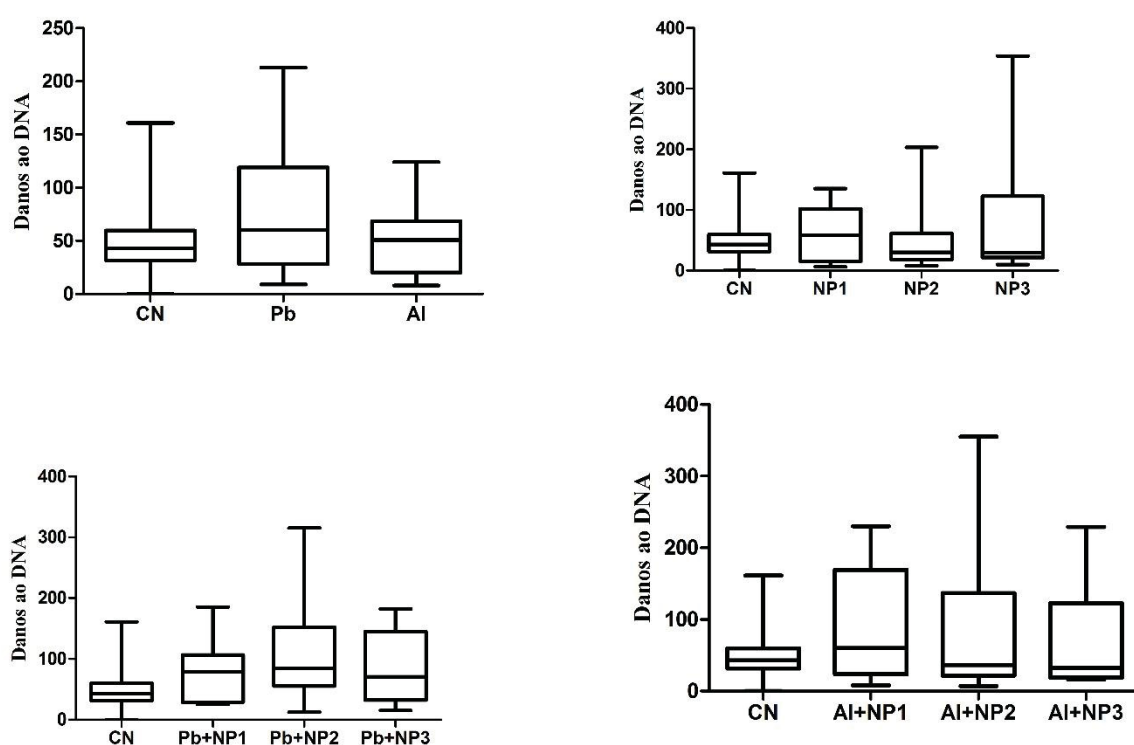


Figura I: Dano ao DNA avaliado pelo teste do cometa em eritrócitos de *H. intermedius* após exposição aguda (96 h) a nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO₂) nas doses de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$; (NP1, NP2, e NP3, respectivamente) e co-exposição com chumbo (Pb 21 $\mu\text{g g}^{-1}$) e alumínio (Al 50 $\mu\text{g g}^{-1}$). Nos gráficos estão representadas as medianas, primeiro e terceiro quartil. * representa diferença significativa com o controle negativo (CN) com nível de significância de $p < 0.05$.

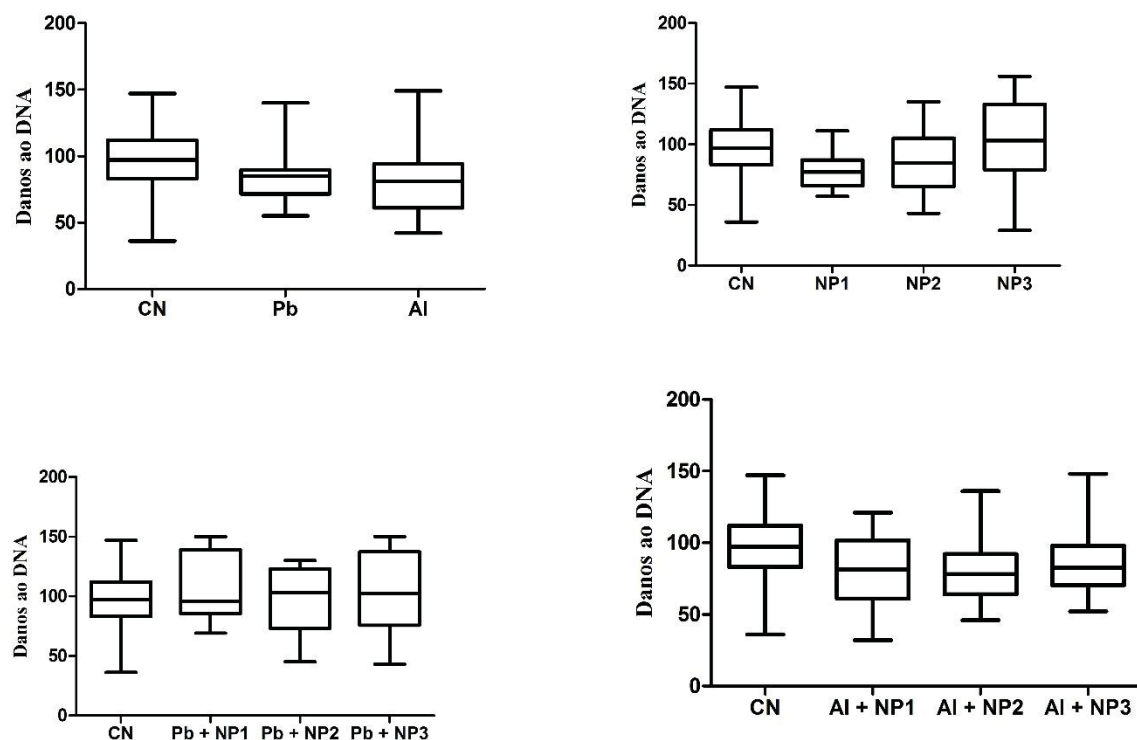


Figura II: Dano ao DNA avaliado pelo teste do cometa em células renais de *H. intermedius* após exposição aguda (96 h) a nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO₂) nas doses de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$; (NP1, NP2, e NP3, respectivamente) e co-exposição com chumbo (Pb 21 $\mu\text{g g}^{-1}$) e alumínio (Al 50 $\mu\text{g g}^{-1}$). Nos gráficos estão representadas as medianas, primeiro e terceiro quartil. * representa diferença significativa com o controle negativo (CN) com nível de significância de $p < 0.05$.

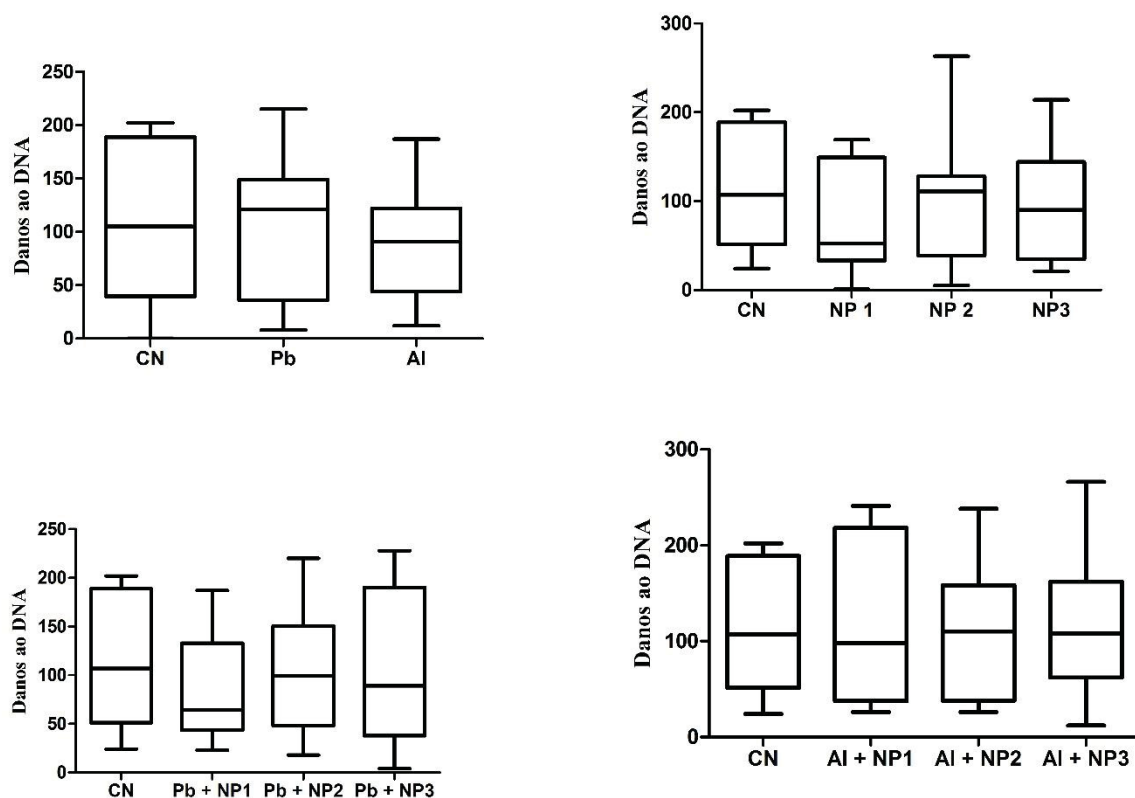


Figura III: Dano ao DNA avaliado pelo teste do cometa em células do cérebro de *H. intermedius* após exposição aguda (96 h) a nanopartículas de Dióxido de Titânio (nano-TiO₂) nas doses de 0,1; 1 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$; (NP1, NP2, e NP3, respectivamente) e co-exposição com chumbo (Pb 21 $\mu\text{g g}^{-1}$) e alumínio (Al 50 $\mu\text{g g}^{-1}$). Nos gráficos estão representadas as medianas, primeiro e terceiro quartil. * representa diferença significativa com o controle negativo (CN) com nível de significância de $p < 0.05$.